

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-528930

(P2003-528930A)

(43) 公表日 平成15年9月30日(2003.9.30)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
31/7088		31/7088	4 C 0 8 5
31/7105		31/7105	4 C 0 8 6
35/42		35/42	4 C 0 8 7
39/395		39/395	T
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2001-572145(P2001-572145)	(71) 出願人	ノヴァークス
(86) (22) 出願日	平成13年3月30日(2001.3.30)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月30日(2002.9.30)		-2635 サン ディエゴ スイート エー
(86) 国際出願番号	P C T / U S 0 1 / 1 0 3 3 9		カミノ サンタ フェ 8395
(87) 国際公開番号	W O 0 1 / 0 7 4 4 0 4	(72) 発明者	ファクライ, ハビブ
(87) 国際公開日	平成13年10月11日(2001.10.11)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 9 3, 4 9 7		ラ ジョラ カミノ プリマベラ 8886
(32) 優先日	平成12年3月31日(2000.3.31)	(74) 代理人	弁理士 遠山 勉 (外3名)
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 T G F  $\beta$  阻害剤を発現する遺伝的に改変された細胞であって、肺癌細胞である細胞

(57) 【要約】

本発明は、T G F  $\beta$  の発現を抑制するのに有効な T G F  $\beta$  阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む遺伝的に改変された細胞を、治療上有効量含む組成物(ここで遺伝的に改変された細胞は、非小細胞肺癌(N S C L C)または小細胞肺癌(S C L C)である)、およびその関連方法に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 治療上有効な量の、 $TGF\beta$ の発現を低減するのに有効な $TGF\beta$ 阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む遺伝的に改変された細胞を含む組成物であって、前記遺伝的に改変された細胞は、肺癌細胞である組成物。

【請求項2】 治療上有効な量の、 $TGF\beta$ の発現を低減するのに有効な $TGF\beta$ 阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む遺伝的に改変された細胞を含む組成物の使用であって、前記遺伝的に改変された細胞は、肺癌を有する被験体の生存を延ばすための薬剤の調製のための肺癌細胞である使用。

【請求項3】 治療上有効な量の、 $TGF\beta$ の発現を低減するのに有効な $TGF\beta$ 阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む遺伝的に改変された細胞を含む組成物を前記被験体に投与するステップを含む、肺癌を有する該被験体の生存を延ばす方法であって、前記遺伝的に改変された細胞は、肺癌細胞である方法。

【請求項4】 前記肺癌細胞は、非小細胞肺癌（NSCLC）細胞である、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項5】 前記肺癌細胞は、小細胞肺癌（SCLC）細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項6】 前記 $TGF\beta$ は、 $TGF\beta-1$ である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項7】 前記 $TGF\beta$ は、 $TGF\beta-2$ である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項8】 前記 $TGF\beta$ は、 $TGF\beta-3$ である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項9】 前記遺伝的に改変された細胞は、自己細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項10】 前記遺伝的に改変された細胞は、同種異系細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項11】 前記遺伝的に改変された細胞は、自己細胞および同種異系細胞の混合物である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項12】 前記遺伝的に改変された細胞は、免疫賦活性効果を有する1つまたはそれ以上のサイトカインをさらに発現する、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項13】 前記1つまたはそれ以上のサイトカインは、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-8、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12、インターロイキン-15、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、腫瘍壊死因子- $\alpha$ 、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子からなる群から選択される、請求項12に記載の組成物、使用または方法。

【請求項14】 前記TGF $\beta$ 阻害剤は、アンチセンスである、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項15】 前記TGF $\beta$ 阻害剤は、配列番号1の配列を有するアンチセンスである、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項16】 前記TGF $\beta$ 阻害剤は、リボザイムである、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項17】 前記TGF $\beta$ 阻害剤は、優性ネガティブ突然変異体である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項18】 前記TGF $\beta$ 阻害剤は、抗体である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項19】 前記TGF $\beta$ 阻害剤は、TGF $\beta$ 受容体およびSmadタンパク質相互作用を妨げる、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

【請求項20】 前記組成物は、単位投薬形態で提供される、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物、使用または方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## [発明の背景]

## 発明の分野

本発明は、 $TGF\beta$ の発現を抑制するのに有効な $TGF\beta$ 阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む遺伝的に改変された細胞を、治療上有効な量を含む組成物（ここで、遺伝的に改変された組成物は、非小細胞肺癌（NSCLC）または小細胞肺癌（SCLC）細胞である）、およびその関連方法に関する。

## 【0002】

## 関連技術の説明

肺癌は、依然として西洋の世界で最も一般的な癌であり、癌に関連する死亡原因の30%を占める(Ramanathan and Belani, 1997)。肺癌を伴う患者の現時点での予後は低い。全体の治癒率は、13%程度と低いものと推定される。1999年のアメリカ合衆国では、約180,000人の新たな肺癌患者が予測される。これらの患者の大部分はその疾患により死亡し、1999年に全国的に肺癌による死亡者は160,000人になると予測される。

## 【0003】

肺癌の2つの主要な細分、すなわち1) 非小細胞肺癌（NSCLC）および2) 小細胞肺癌（SCLC）が存在する。これらの2つの疾患においては、治療アプローチおよび自然史が異なる。アメリカ合衆国における肺癌の症例の大部分（80%）は、NSCLCである。NSCLCおよびSCLCの両方に関する重要な臨床的および予後的な要素が、過去20年間で理解されてきたが、治療上の結果においてはわずかな改善しかされてこなかった。NSCLCを伴う患者のための唯一の治療的オプションは、腫瘍がまだ局在化している初期段階疾患（段階I & II）を有する患者における局所治療（外科的切除または局所照射）である。しかしながら、診断で、NSCLCを有する患者の大部分は、進行性疾患があり、外科手術だけでは治癒することはできない。進行段階の疾患において、全身性化学療法および／または照射は、目的とする応答および症状の一時的な緩和をもたらすことができるが、それらによっては、生存期間および生存率の改善は限られ

ている。切除できない疾患を有する患者の生存中央値は、6～12ヶ月である。段階ⅢⅢⅢBおよびⅣのNSCLCに関する2年生存率は、それぞれ10.8%および5.4%である。同様に、5年生存率は、3.9%および1.3%である。近年、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテール）、トポテカン、イリノテカン、ビノレルビン、およびゲムシタビンを含む幾つかの新規薬剤が、NSCLCの治療のために利用可能となってきた。これらの薬剤は、従来の化学療法剤（エトポシド、シスプラチンおよびカルボプラチン）の改良物ではあるが、全体の治癒率は依然として低いままである。

#### 【0004】

SCLCは、初期段階に、多くの場合に転移する非常に攻撃的な癌であり、それは、診断からの生存中間値がたった2～4ヶ月である。外科的切除または放射線療法のような局所的な治療によっては、この癌の遠位の転移性のために、生存期間が長期になるのはまれである。化学療法を用いることにより、療法を施されていない患者と比較して少なくとも4～5倍の生存中間値に生存を延ばすことができるが、5年目の全体の生存率は、依然としてたった5～10%である。

#### 【0005】

現在の治療方法によっては、NSCLCまたはSCLC患者の段階にて、平均余命が有意に延長できないため、これらの患者のための新規治療的アプローチを探究することは当然である。

#### 【0006】

##### [発明の概要]

種々の組織源の腫瘍を有する患者は、トランスフォーミング成長因子- $\beta$  (TGF $\beta$ ) のレベルが上昇している。TGF $\beta$ は、免疫抑制と関連した成長因子である。患者の免疫系が抑制されると、まず、腫瘍を認識および破壊する能力がなくなる。さらに、患者の免疫性の抑制により、患者は頻繁に感染しやすくなる。TGF $\beta$ の産生を阻止するように遺伝子的に操作した腫瘍細胞を注射すると、遺伝子改変細胞が強力なワクチンとなり、それがその腫瘍に対する免疫系により認識され、かつその免疫系を活性化することができる。続いて免疫系の活性化は、宿主生体において変更されていない親腫瘍の認識および抑制を引き起こす。この

現象は、動物腫瘍モデルにて、およびヒトの臨床試験にて適用される。したがって、本発明者等は、非小細胞肺癌段階および小細胞肺癌段階を有する患者においてこのアプローチを使用することを提案する。

#### 【0007】

[好ましい実施形態の詳細な説明]

肺癌は、アメリカ合衆国において癌に起因するすべての死亡原因のうちの30%を占める(Ramanathan and Belani, 1997)。肺癌の全体の治癒率は、13%であり、非小細胞肺癌(NSCLC)および小細胞肺癌(SCLC)を有する患者の現時での予後は、依然として低いままである。

#### 【0008】

進行性の腫瘍成長を伴う患者は免疫機能が弱まっているということが立証されている(Jakowlew et al. 1995, Ransohoff et al. 1991; Holladay et al. 1992a; Holladay et al. 1992b)。この機能障害は、一般的に顕著な免疫の応答性の低下を特徴とし、それは腫瘍に特異的な免疫性だけでなく、むしろ免疫系全体にわたって観察されることが多い。この機能障害は、特に細胞性およびT細胞分画(コンパートメント)にて明らかであり、T細胞リンパ球の減少、ならびに腫瘍特異的刺激および非腫瘍特異的刺激の両方に対するT細胞の応答性が低下することを特徴とする(Ransohoff et al. 1991)。腫瘍が免疫監視機構を逃れ得る1つの方法は、MHCクラスI分子およびクラスII分子の発現をより低レベルにすることによるものである。さらに腫瘍は、TGF $\beta$ のような免疫抑制剤分子の発現を増加することにより免疫監視機構を逃れ得る。これらの機構の組合せを利用する腫瘍は一般的に知られている。

#### 【0009】

遺伝子治療は、近年かなりの注目を集めている。腫瘍抗原提示を増大させ、特定の抗腫瘍免疫性を誘発するように設計した腫瘍細胞をワクチン接種をすることは、期待されたにもかかわらず、限られた結果しかもたらさなかった(Holladay et al. 1992)。癌生物学およびベクター技術における開発について本発明者等が理解を進展させたことにより、腫瘍ワクチンアプローチが治療に用いられる可能性を前進させている。特定の腫瘍抑制剤遺伝子、免疫モジュレーター、薬剤感受

性遺伝子およびアンチセンス遺伝子切片を発現するように、ワクチン接種用の腫瘍細胞を遺伝的に改変することは今や可能である (Huber et al. 1991; Culver et al. 1992; Trojan et al. 1992; Dranoff et al. 1993; Ram et al. 1993; Trojan et al. 1993; Swisher et al. 1999)。特に、前臨床および臨床研究は、肺癌の治療における遺伝子治療アプローチの可能性を実証する。前臨床肺癌モデルでは、サイトカイン GM-CSF および薬剤感受性遺伝子を発現するように遺伝的に改変された同種異系肺癌系である、同系の骨髓由来の樹状細胞が混入する単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを用いて、樹立腫瘍の後退および免疫原性の増大が示された (Miller et al. 1998)。レトロウイルス遺伝子治療を用いた患者における第 I 相臨床試験の予備的結果は、遺伝子治療が十分に耐容性であり、毒性がないことを示す (Swisher et al. 1998)。

#### 【0010】

トランスフォーミング成長因子  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) は、多くの正常細胞型および腫瘍性細胞型の成長ならびに機能を調節する多機能タンパク質の一科である (Sporn et al. 1986; Massague 1987; Border and Rouslahti 1992; Jachimczak et al. 1993)。TGF  $\beta$  は、様々な細胞型に対して広範な効果を発揮し、細胞成長を刺激または抑制し、アポトーシスを誘導し、血管新生を増加させることがわかっている (Merzak et al. 1994; Jennings et al. 1994; Ashley et al. 1998a; Ashley et al. 1998b; Jennings et al. 1998)。これらの効果は、シグナルの形質導入段階で伝達される。TGF  $\beta$  シグナル伝達は、20種以上の遺伝子の発現に影響を及ぼすことが見出されている (Baker and Harland 1997; Heldin et al. 1997; Stiles 1997; Yingling et al. 1997)。

#### 【0011】

TGF  $\beta$  は、TGF  $\beta$  1、TGF  $\beta$  2 および TGF  $\beta$  3 として知られる3つのイソ体で存在する。それらのアミノ酸配列は、70～80%程度の相同性を示す。ヒト TGF  $\beta$  タンパク質およびそれらをコードしている遺伝子は、当該技術分野で既知である。具体的には、ヒト供給源由来の TGF  $\beta$  1 mRNA (GenBank アクセッション番号第 XM\_008912 号および第 NM\_000660 号)、TGF  $\beta$  2 mRNA (GenBank アクセッション番号第 XM\_00175

4号および第NM\_\_003238号)、およびTGF $\beta$ 3 mRNA (GenBank  
アクセッション番号第XM\_\_007417号) が立証されている。

【0012】

TGF $\beta$ 受容体タンパク質は、I型(55 kDa)またはII型(70 kDa)  
)であり得る。TGF $\beta$ 受容体タンパク質およびそれらをコードしている遺伝子  
もまた、当該技術分野で既知である。ヒトTGF $\beta$ 受容体I型 mRNA (GenB  
ank アクセッション番号第XM\_\_005591号) およびヒトTGF $\beta$ 受容体  
II型 mRNA (GenBank アクセッション番号第XM\_\_003094号) は、  
当該技術分野で文献公知である。

【0013】

TGF $\beta$ スーパーファミリーのサイトカインは、特定セリン／トレオニンキナ  
ーゼ受容体に結合し、Smadタンパク質を通じて細胞内シグナルを伝達する。  
リガンドを刺激すると、Smadは、核へと移動し、転写複合体の構成成分とし  
て機能する。TGF $\beta$ シグナル伝達は、様々な機構により正および負に調節され  
る。正の調節は、生物活性に十分なレベルにシグナルを増幅する。負の調節は、  
細胞外レベル、膜レベル、細胞質レベルおよび核レベルにて生じる。

【0014】

NSCLCおよびSCLCを含む多くの腫瘍は、活性TGF $\beta$ の産生が高レベ  
ルである(Constam et al. 1992; Eastham et al. 1995; Friedman et al. 1995;  
Jakowlew et al. 1995; Kong et al. 1995; Yamada et al. 1995; Eder et al.  
1996)。TGF $\beta$ レベルの上昇はまた、免疫抑制と関連していた(Sporn et al.  
1986; Massague 1987; Bodmer et al. 1989; Border and Rouslahti 1992; Chen  
et al. 1997)。TGF $\beta$ は、抗原刺激に応答してT細胞が活性化するのを抑制  
する。さらに、TGF $\beta$ は、ナチュラルキラー(NK)細胞、ならびにリンホカ  
イン活性化キラー(LAK)細胞の誘発および増殖に対する拮抗的效果を有する  
(Rook et al. 1986; Kasid et al. 1988; Tsunawaki et al. 1988; Hirte et al.  
. 1991; Ruffini et al. 1993; Naganuma et al. 1996)。これを支持して、TGF  
F $\beta$ レベルと生存間の相関関係が結腸癌にて実証された(Friedman et al. 1995)  
。再発率は、腫瘍のTGF $\beta$ の産生が低レベルである患者に比べて、腫瘍のTG



F $\beta$ の産生が高レベルである患者において18倍も高かった。この相関関係は、原発性の腫瘍の結節状態および分化の度合いとは無関係であった。

【0015】

免疫抑制というTGF $\beta$ の役割を考慮して、本発明者等は、NSCLC腫瘍ワクチン接種によるTGF $\beta$ 抑制の効果を評価することを試みた。TGF $\beta$ 阻害剤アプローチを用いて、本発明者等は、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2およびTGF $\beta$ 3、ならびにそれらの混合物から選択されるTGF $\beta$ アンチセンスで多数のNSCLC細胞をトランスフェクトした。TGF $\beta$ 2アンチセンスは、TGF $\beta$ 1アンチセンス、またはTGF $\beta$ 1アンチセンスおよびTGF $\beta$ 2アンチセンスの組合せと比べて、TGF $\beta$ 発現をダウンレギュレートする点で優れていることが実証されていることから選択された。次にこれらの遺伝的に改変されたNSCLC細胞は増殖を防止するために照射され、多数の異なる動物腫瘍被験体に注射された。本発明者等は、ワクチンの構成成分としてこれまで無効だったNSCLC細胞をかかると遺伝的改変により有効にさせることができることを見いだした。TGF $\beta$ 発現の阻止は、これらの動物の免疫原性を増加させた。さらに、かかるワクチン接種は、これまでに内植した腫瘍を根絶させ、腫瘍攻撃から動物を保護した。

【0016】

免疫抑制におけるTGF $\beta$ の役割を考慮して、本発明者等は、SCLC腫瘍ワクチン接種によるTGF $\beta$ 抑制の効果を評価することを企図する。TGF $\beta$ 阻害剤アプローチを用いて、本発明者等は、TGF $\beta$ 1アンチセンス、TGF $\beta$ 2アンチセンスおよびTGF $\beta$ 3アンチセンス、ならびにそれらの混合物から選択されるTGF $\beta$ アンチセンスで多数のSCLC細胞をトランスフェクトすることを企図する。次にこれらの遺伝的に改変されたSCLC細胞は増殖を防止するために照射され、多数の異なる動物腫瘍被験体に注射された。本発明者等は、ワクチンの構成成分としてこれまで無効だったSCLC細胞をかかると遺伝的改変により有効にさせることができることを見いだすことを企図する。TGF $\beta$ 発現の阻止は、これらの動物の免疫原性を増加させるものと企図される。さらに、かかるワクチン接種は、これまでに内植した腫瘍を根絶させ、腫瘍攻撃から動物を保護するものと企図される。

## 【0017】

本発明者等は、NSCLC腫瘍モデルにおいてこのアプローチの有効性を示した。KLN-205 NSCLC腫瘍モデルにおいて、 $5 \times 10^5$ 個の照射TGF $\beta$ 2アンチセンス遺伝子で改変された自己NSCLC細胞を、2回の注射で、DB2マウスにワクチン接種した。これにより、接種後の $10^6$ 個の未改変KLN-205 NSCLC細胞による腹腔内（i. p.）腫瘍攻撃に対して、動物を保護することが可能であった。この肺癌腫瘍モデルにおける腫瘍根絶実験では、1週齢の腫瘍を有する動物に、TGF $\beta$ 2アンチセンス遺伝子改変細胞のワクチンの接種をすると、顕著な腫瘍後退を生じ、ワクチンの接種をしなかった対照群と比較して、腫瘍が発生することなく生存期間が延長した。

## 【0018】

Fakhrai et al. 1996は、ラットの神経膠腫瘍においてこのアプローチの有効性を実証した。9L神経膠肉腫腫瘍モデルにおいて、Fisher-344ラットに、わずか300個程度と少ない数の腫瘍細胞を頭蓋内移植したところ、6週後に99%を超える致死率をもたらした。Fakhrai et al. 1996は、ラットの脳に $5 \times 10^3$ 個の腫瘍細胞を移植し、腫瘍ワクチン接種を施した。TGF $\beta$ 2アンチセンス改変9L細胞またはIL-2を分泌するように遺伝的に改変されたTGF $\beta$ 2アンチセンス改変9L細胞で免疫化された動物は、研究の継続期間、腫瘍が発生しない状態のままであった（24匹のうちの24匹、すなわち腫瘍が発生することなく生存した率は100%）。対照的に、空のベクターを含む細胞で免疫化した対照群の大部分（15匹のうちの2匹以外）は、腫瘍の発達が見られ、5週以内に安楽死させなくてはならなかった（腫瘍が発生することなく生存した率は13%、 $p < 0.01$ ）。

## 【0019】

Liau et al. 1998は、ラットC-6神経膠腫腫瘍モデルにおいてTGF $\beta$ 2アンチセンス遺伝子治療の同様の有効性を実証した。Dorigo et al. 1998は、マウス卵巣奇形腫（MOT）腫瘍モデルにおいてこのアプローチの有効性を示した。しかしながら、TGF $\beta$ アンチセンスおよびIL-2遺伝子改変細胞を接種した群のみが、続く腫瘍細胞攻撃から有意に保護され、したがって、このアプローチ

の経験論が確立された。他のグループにおいても、培養細胞および動物腫瘍モデルにおいて TGF $\beta$  遺伝子治療の同様の抗腫瘍効果を実証した (Kim et al. 1997)。

#### 【0020】

遺伝子治療は、近年かなりの注目を集めている。腫瘍抗原提示を増大させ、特定の抗腫瘍免疫性を誘発するように設計した腫瘍細胞のワクチンの接種は、期待できるが、限られた結果しかもたらさなかった。癌生物学およびベクター技術開発について本発明者等が理解を進展させたため、腫瘍ワクチンの治療的可能性を前進させている。特定の腫瘍抑制剤遺伝子、免疫モジュレーター、薬剤感受性遺伝子およびアンチセンス遺伝子断片を発現するように、ワクチン接種用の腫瘍細胞を遺伝的に改変することは今や可能である (Huber et al. 1991; Culver et al. 1992; Trojan et al. 1992; Dranoff et al. 1993; Ram et al. 1993; Trojan et al. 1993)。

#### 【0021】

多くの臨床研究においては、脳癌、皮膚癌、結腸癌および乳癌のための免疫療法的治療の主要構成成分として、遺伝的に改変された同種異系細胞が評価されてきた。ワクチン療法は、安全であり、体液性および細胞性抗ワクチン免疫応答を発生させることがわかった。NSCLCを有する患者において遺伝子治療を用いた幾つかの第I相臨床試験からの予備結果からも、このNSCLC患者集団 (Dubinett, 1998; Roth, 1998; Swisher et al. 1998)、ならびにSCLC患者集団についての遺伝子治療アプローチの安全性が実証された。

#### 【0022】

複数のグループが、多数の動物腫瘍モデルおよび臨床の両方で、遺伝子治療の領域の経験則を実証した (例えば、Fakhrai et al. 1995; Sobol et al. 1999)。FDA (連邦食品薬品管理局) は、癌を有する患者における遺伝子改変ワクチン接種の研究について、申請された少なくとも4つの以下のINDをこれまでに承認した：

・Sobol et al., BB-IND # 5812: 「インターロイキン-2 (IL-2) を分泌するように遺伝的に改変され、照射された自己腫瘍細胞および線維芽細胞を結腸

癌腫患者に注射すること。第Ⅰ相研究(Injection of colon carcinoma patients with autologous irradiated tumor cells and fibroblasts genetically modified to secrete interleukin-2 (IL-2). A Phase I study)」

・Sobol et al., BB-IND #4840: 「インターロイキン-2 (IL-2) を分泌するように遺伝的に改変された腫瘍細胞または線維芽細胞を用いた神経膠芽細胞の活性免疫療法(Active immunotherapy of glioblastoma with tumor cells or fibroblasts genetically modified to secrete interleukin-2 (IL-2))」

・Sobol et al., BB-IND #7483: 「結腸直腸癌腫を有する患者について、インターロイキン-2 を分泌するように遺伝的に改変された同種異系線維芽細胞と混合し、B7. 1 を発現するように遺伝的に改変された同種異系腫瘍細胞 (CD80) の第Ⅰ相研究(A Phase I Study of Allogeneic Tumor Cell Genetically Modified to Express B7.1 (CD80) Mixed with Allogeneic Fibroblasts Genetically Modified to Secrete IL-2 in Patients with Colorectal Carcinoma)」

・Fakhrai et al. BB-IND #6658: 「第Ⅰ相臨床試験のための提案: 照射された TGF $\beta$  2 アンチセンス遺伝子改変自己腫瘍細胞を悪性神経膠腫患者へ注射することの安全性の第Ⅰ相研究(Proposal for a Phase I Clinical Trial: A Phase I Study of the Safety of Injecting Malignant Glioma Patients with Irradiated TGF $\beta$  2 Antisense Gene-Modified Autologous Tumor Cells)」

#### 【0023】

BB-IND #6658では、FDAは、重度な神経膠腫を有する患者においてTGF $\beta$  2 アンチセンス遺伝子治療を評価する第Ⅰ相INDを承認した。患者に、TGF $\beta$  2 アンチセンスプラスミドで遺伝的に改変された自己神経膠腫腫瘍細胞をワクチン接種して、TGF $\beta$  2 の発現を阻止した。治療は、最初の4ヶ月は3週毎に、それ以降は1～2ヶ月毎に $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ または $2 \times 10^7$ 個の細胞を皮内注射することにより構成された。現在までに、5人の患者を治療してきた。同じINDのもとで、FDAは、小児神経膠腫を有する患者において、同じTGF $\beta$  2 アンチセンスベクターで遺伝子改変され、部分的にハプロタイプが適合した同種異系神経膠腫細胞系の使用を特別に承認した。

#### 【0024】

治療全体は、十分に耐容性であり、きわめて低度の一過性の毒性だけが報告された。完全血球算定、血清化学に関して、および尿検査のモニタリング時における、免疫化部位における有意の副作用も、治療に関連した異常性も観察されなかった。幾つかの場合では、TGF $\beta$ 2 アンチセンス遺伝子改変自己腫瘍細胞の第2回目および第3回目の皮下注射後に、注射部位にて一過性の穏やかな紅斑が観察された。

#### 【0025】

増加したレベルのCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、およびCD8<sup>+</sup>エフェクター細胞が、注射部位で浸潤していることが、二次腫瘍生体組織検査にて観察された。注射部位における生検材料、および続く作用で得られる腫瘍について免疫組織検査したところ、遺伝子治療の開始前に採取した生検材料と比べて、有意に多量の免疫が浸潤していることを実証した。

#### 【0026】

治療した5人の患者のうち、1人の患者が臨床的応答を示し、2人の患者が免疫応答の増加を示し、1人の患者が腫瘍進行を示したが、5人目の患者はなお治療を受けている。臨床的応答を示した患者においては、全腫瘍サイズの適度の変化が見られる治療開始後の三ヶ月の間、約6週間隔で全体のMRIスキャンを実施した。デカドロンにおける変化に関連して、腫瘍周囲の浮腫が一進一退している様子を観察することができた。しかしながら、応答の3ヶ月後に、さらなる改善をして、7ヶ月までには腫瘍後退していることが、MRIスキャンによって明らかになった。

#### 【0027】

したがって、第I相臨床試験により、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、または $2 \times 10^7$ のTGF $\beta$ 2 アンチセンス遺伝子改変自己腫瘍細胞またはハプロタイプ適合腫瘍細胞を患者に注射することは安全性のあることが実証された。さらに、このワクチン接種療法により見られる免疫原性の増加および予備臨床的応答の認識が進んでいる。本発明者等は、NSCLCまたはSCLCを有する患者におけるこの遺伝子治療アプローチの適用を企図する。

#### 【0028】

本発明は、治療上有効な量の、 $TGF\beta$ の発現を低減するのに有効な $TGF\beta$ 阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む遺伝的に改変された細胞を被験体に投与することを含む、非小細胞肺癌（NSCLC）または小細胞肺癌（SCLC）を有する被験体の生存を延ばすための方法および組成物を含み、ここで遺伝的に改変される細胞は、NSCLCまたはSCLC細胞である。 $TGF\beta$ を無効にするか、または $TGF\beta$ 遺伝子の発現（転写または翻訳）を抑制するいかなる方法をも、被験体の生存を達成するのに使用することができる。かかるアプローチは、治療用途のために、すなわちNSCLCまたはSCLCを治療するのに有用であり得る。

#### 【0029】

一実施形態では、生存治療様式は、例えば、 $TGF\beta$  mRNA転写物の翻訳を低減もしくは抑制するためのアンチセンスまたはリボザイムアプローチを用いて、 $TGF\beta$ 遺伝子の転写を抑制する三重らせんアプローチを用いて、あるいは $TGF\beta$ 遺伝子もしくはその内因性プロモーターを不活性化または「ノックアウト」するための標的相同組換えを用いて、内因性 $TGF\beta$ 遺伝子発現レベルを低減するように設計され得る。

#### 【0030】

アンチセンスアプローチには、 $TGF\beta$  mRNAに相補的なオリゴヌクレオチド（DNAまたはRNA）の設計が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的 $TGF\beta$  mRNA転写物に結合し、翻訳を防止するであろう。絶対的な相補性が好ましいが、必須ではない。本明細書で称する場合、RNAの一部に対する配列「相補性」とは、そのRNAとハイブリダイズすることが可能であるのに十分な相補性を有する配列であって、安定な二重鎖を形成することのできる配列を意味する。したがって、二重鎖アンチセンス核酸の場合、二重鎖DNAの一本鎖が試験されてもよく、または三重鎖形成がアッセイされてもよい。ハイブリダイズする能力は、アンチセンス核酸の相補性および長さの両方に依存するであろう。一般に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、RNAとの誤った塩基対合を多く含有する可能性があるものの、安定な二重鎖（または場合によっては三重鎖）を形成しうる。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融解温度を確

定するための標準的手法を用いて、塩基対合の誤りの許容度を確認することができる。

#### 【0031】

メッセージの5'末端、例えばAUG開始コドンまでを含んでいる5'非翻訳配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳を抑制する際に最も有効に作用すべきである。しかしながら、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列も同様に、mRNAの翻訳の抑制時に有効であることがわかっている。概して、Wagner, R., 1994, Nature 372:333-335を参照されたい。したがって、TGF $\beta$ の5'または3'非翻訳の非コード領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性TGF $\beta$  mRNAの翻訳を抑制するために、アンチセンスアプローチにて使用することができる。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補体を含むべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖はまた、本発明により使用することができる。TGF $\beta$  mRNAの5'-、3'-またはコード領域のいずれにハイブリダイズするように設計されていようと、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長であるべきであり、好ましくは6~約50ヌクレオチド長の範囲のオリゴヌクレオチドである。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも50ヌクレオチドである。

#### 【0032】

標的配列の選択に関係なく、アンチセンスオリゴヌクレオチドの、遺伝子発現を抑制する能力を定量するために、まずインビトロでの研究がなされることが好ましい。これらの研究は、オリゴヌクレオチドのアンチセンス遺伝子抑制と、非特異的生物学的効果とを区別するための対照を利用することが好ましい。これらの研究は、標的RNAまたはタンパク質のレベルを、内部対照RNAまたはタンパク質のレベルと比較することもまた好ましい。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて得られる結果は、対照オリゴヌクレオチドを用いて得られる結果と比較することが企図される。対照オリゴヌクレオチドは、試験するオリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであることが好ましく、その対照オリゴヌクレオチ

ドのヌクレオチド配列は、標的配列に対して特異的にハイブリダイズすることがない程度に、アンチセンス配列と異なることが好ましい。

### 【0033】

オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖の、DNAまたはRNA、あるいはそれらのキメラ混合物または誘導体または修飾体であり得る。オリゴヌクレオチドは、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション等を改善するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸バックボーンを修飾され得る。オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付属基（例えば、宿主細胞受容体を標的化するため）、または細胞膜を通過する輸送を容易にする作用物質を含んでもよい（例えば、Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556、Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652、PCT国際公開第88/09810号（1998年12月15日に公開）を参照）。

### 【0034】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$ -D-ガラクトシルキユエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 $\beta$ -D-マンノシルキユエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp



3) w、および2, 6-ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない群から選択され、少なくとも1つの修飾塩基部分を含んでもよい。

#### 【0035】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースを含むが、これらに限定されない群から選択される、少なくとも1つの修飾糖部分を含んでもよい。

#### 【0036】

さらなる別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホルアミドチオエート、ホスホルアミデート、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール、またはそれらの類縁体からなる群から選択され、少なくとも1つのリン酸バックボーンを含む。

#### 【0037】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成機（例えば、Biosearch, Applied Biosystems等から市販されている）を用いて、当該技術分野で周知の標準的な方法により合成され得る。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Stein等の方法により合成されてもよく(1988, *Nucl. Acids Res.* 16:3209)、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御孔ガラスポリマー支持体(Sarin et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451)等を用いて調製することができる。

#### 【0038】

しかしながら、内因性mRNAの翻訳を抑制するのに十分なアンチセンスの細胞内濃度を達成するのは多くの場合困難である。したがって、利便性のよいアプローチとして、アンチセンス配列が強力なプロモーターの制御下に置かれている組換えDNA構築物を利用する方法がある。標的細胞をトランスフェクトするためにかかる構築物を使用すると、内因性TGF $\beta$ 転写物に相補的な塩基対を形成し、それによりTGF $\beta$  mRNAの翻訳を阻害するであろう一本鎖RNAの転写を十分に生じる結果となろう。例えば、細胞に取り込まれ、アンチセンスRNAの転写を誘導するようなベクターが導入され得る。かかるベクターは、所望の

アンチセンスRNAを産生するように転写され得る限り、エピゾームとしてとどまるか、あるいは染色体に組み込まれ得る。かかるベクターは、当該技術分野で標準的な組換えDNA技法により構築することができる。ベクターは、哺乳動物細胞における複製および発現のために使用されるプラスミド、ウイルスまたは当該技術分野で既知の他のものであり得る。アンチセンスRNAをコードする配列を発現させるプロモーターは、哺乳動物、好ましくはヒト細胞において作用することが当該技術分野で既知であるいかなるプロモーターによるものであり得る。かかるプロモーターは、誘導性であっても構成的であってもよい。かかるプロモーターとしては、SV40初期プロモーター領域(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'長い末端反復配列(LTR)に含入されるプロモーター(Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42)等が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0039】

TGF $\beta$  mRNA転写物を触媒的に切断するように分子設計されたりボザイムもまた、TGF $\beta$  mRNAの翻訳およびTGF $\beta$ の発現を防止するのに使用することができる(例えば、1990年10月4日に公開されたPCT国際公開第90/11364号; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225を参照)。特異的認識配列の部位でmRNAを切断するリボザイムは、TGF $\beta$  mRNAを破壊するのに使用することができるが、ハンマーヘッドリボザイムを使用することが好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは、標的mRNAと相補的塩基対を形成するフランキング領域により指示される位置にてmRNAを切断する。唯一の要件は、標的mRNAが以下の2つの塩基配列、すなわち5'-UG-3'を有することである。ハンマーヘッドリボザイムの構築および産生は、当該技術分野で既知であり、Haseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591により完全に記載されている。TGF $\beta$  cDNAのヌクレオチド配列内には、数百もの潜在的なハンマーヘッドリボザイムによって切断され得る部位が存在する。好ましくは、リボザイムは、切断認識部位がTGF $\beta$  mRNAの5'末端付近に

位置するように、すなわち効率的に増加して、非機能性mRNA転写物の細胞内蓄積を最低限に押さえるように操作される。

#### 【0040】

本発明のリボザイムはまた、テトラヒメナ(*Tetrahymena Thermophila*)にて天然に存在し(IVSまたはL-19 IVS RNAとして知られる)、Thomas Cechおよび共同研究者により広範に記載される(Zaug, et al., 1984, Science, 224:574-578; Zaug and Cech, 1986, Science, 231:470-475; Zaug, et al., 1986, Nature, 324:429-433; University Patentsによる国際特許出願国際公開第88/04300号; Been and Cech, 1986, Cell, 47:207-216)もののようなRNAエンドヌクレアーゼ(これ以降、「Cech型リボザイム」)を含む。Cech型リボザイムは、標的RNA配列にハイブリダイズする8塩基対の活性部位を有し、ハイブリダイズした後、標的RNAの切断が起こる。本発明は、TGF $\beta$ に存在する8塩基対の活性部位配列を標的とするCech型リボザイムを含む。

#### 【0041】

アンチセンスアプローチにおける場合と同様に、リボザイムは、修飾されたオリゴヌクレオチドから構成され(例えば、安定性、ターゲティング等の改良のために)、TGF $\beta$ を発現する標的細胞に送達される必要があり得る。送達のための利便性の高い方法は、トランスフェクトされた細胞が内因性TGF $\beta$ メッセージを破壊し、翻訳を抑制するのに十分な量のリボザイムを産生するように、強力なプロモーターの制御下にてリボザイムをコードするDNA構築物を用いることを含む。アンチセンス分子と異なってリボザイムは触媒性であるので、効果を発現する細胞内濃度はアンチセンス分子の場合より低濃度でよい。

#### 【0042】

内因性TGF $\beta$ 遺伝子発現はまた、標的化した相同的組換えすることにより、TGF $\beta$ 遺伝子またはそのプロモーターを不活性化あるいは「ノックアウト」することにより低減され得る(例えば、Smithies et al, 1985, Nature 317:230-234; Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51:503-512; Thompson et al., 1989 Cell 5:313-321を参照)。例えば、内因性TGF $\beta$ 遺伝子(TGF $\beta$ 遺伝子のコード領域または調節領域のいずれか)に相同的であるDNAに隣接する(f l a n k

e d) 突然変異体の非機能性TGF $\beta$  (または完全に関連のないDNA配列) は、選択マーカーおよび/またはネガティブ選択マーカーとともに使用して、またはそれらを用いることなく使用して、TGF $\beta$ を発現する標的細胞をトランスフェクトすることができる。標的化した相同的組換えによるDNA構築物の挿入は、TGF $\beta$ 遺伝子の不活性化を生じる。

#### 【0043】

あるいは、内因性TGF $\beta$ 遺伝子発現は、TGF $\beta$ 遺伝子の調節領域 (すなわち、TGF $\beta$ プロモーターおよび/またはエンハンサー) に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列をターゲティングして、標的細胞におけるTGF $\beta$ 遺伝子の転写を防止する三重らせん構造を形成することにより低減され得る (一般に、Helene, C. 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6):569-84; Helene, C., et al., 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:27-36; およびMaher, L.J., 1992. *Bioassays* 14(12): 807-15を参照)。

#### 【0044】

本発明のさらなる別の実施形態では、TGF $\beta$ の活性を、「優性ネガティブ」アプローチを用いて低減し、被験体の生存という目的を達成しうる。この目的のために、欠損TGF $\beta$ をコードする遺伝的構築物を用いて、隣接細胞におけるTGF $\beta$ の活性を減少させることができる。例えば、ドメインが欠失しているTGF $\beta$ 、またはドメインが突然変異しているTGF $\beta$ の発現を誘導するヌクレオチド配列を、標的細胞に導入することができる。あるいは、標的相同組換えを利用して、標的細胞の内因性TGF $\beta$ 遺伝子に、かかる欠失または突然変異をさせることができる。操作した細胞は、非機能性サイトカイン (すなわち、その天然の受容体に結合することは可能であるが、シグナル伝達是不可能的なサイトカイン) を発現するであろう。かかる細胞の操作をすることにより、隣接細胞において内因性TGF $\beta$ リガンドに対する応答性が減少し、よって被験体の生存をもたらすはずである。

#### 【0045】

代替的实施形態では、細胞内TGF $\beta$ に結合し、それを「無効にする」可溶性ペプチド、タンパク質、融合タンパク質または抗体をコードする遺伝的構築物を

投与することにより、被験体の生存を達成する。この目的のために、TGF $\beta$ 受容体のドメイン、TGF $\beta$ 受容体の欠失突然変異体、あるいはこれらのTGF $\beta$ 受容体ドメインまたは突然変異体のいずれかに相当し、別のポリペプチド（例えば、IgFcポリペプチド）との融合ペプチドをコードする遺伝的構築物を利用することができる。あるいは、TGF $\beta$ 受容体を模倣し、TGF $\beta$ を無効にする抗イディオタイプ抗体または抗イディオタイプ抗体の抗原結合フラグメント（Fab）をコードする遺伝的構築物を使用することができる。これらのTGF $\beta$ 受容体ペプチド、タンパク質、融合タンパク質、抗イディオタイプ抗体またはその抗原結合フラグメント（Fab）をコードするかかる遺伝的構築物は、TGF $\beta$ を無効にし、被験体の生存を達成するために投与される。

#### 【0046】

1つまたはそれ以上のTGF $\beta$ のエピトープ、またはTGF $\beta$ の保存変異体のエピトープ、あるいはTGF $\beta$ のペプチド断片を特異的に認識する抗体をコードする遺伝的構築物もまた本発明に含まれる。かかる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAbs）、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、F（ab'）<sub>2</sub>断片、Fab発現ライブラリーにより産生される断片、および上記のいずれかのエピトープ結合断片が挙げられるが、これらに限定されない。かかる抗体をコードする遺伝的構築物は、TGF $\beta$ 活性の抑制および被験体の生存の達成のための方法として使用されてもよい。

#### 【0047】

抗体の産生のために、様々な宿主動物が、TGF $\beta$ 、TGF $\beta$ ペプチド、切断型TGF $\beta$ 、TGF $\beta$ の機能的等価体またはTGFの突然変異体を注射することにより免疫化され得る。かかる宿主動物としては、数種であるが例を挙げるとウサギ、マウスおよびラットが挙げられるが、これらに限定されない。ポリクローナル抗体は、免疫化動物の血清から得られる抗体分子の異種集団である。

#### 【0048】

モノクローナル抗体は、特定の抗原に対する抗体の同種集団であるが、それは培養における連続細胞系による抗体分子を産生する任意の技法により得られ得る。これらの方法としては、Kohler and Milsteinのハイブリドーマ技法(1975, Na

ture 256: 495-497, および米国特許第4, 376, 110号)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030)、およびE B V-ハイブリドーマ技法(Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)が挙げられるが、これらに限定されない。かかる抗体は、Ig G、Ig M、Ig E、Ig A、Ig Dを含む任意の免疫グロブリンクラスおよびそれらのサブクラスであってもよい。

#### 【0049】

さらに、適切な生物活性を有するヒト抗体分子に由来する遺伝子とともに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることにより、「キメラ抗体」を産生するために開発された技法(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314:452-454)を使用することができる。キメラ抗体は、マウスmAbから得られる可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するもののような、異なる動物種から得られる種々の部位からなる分子である。

#### 【0050】

あるいは、一本鎖抗体の産生に関して記載される技法(米国特許第4, 946, 778号; Bird, 1988, Science 242: 423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; およびWard et al., 1989, Nature 334: 544-546)は、TGF $\beta$ 遺伝子産物に対する一本鎖抗体を産生するのに用いられ得る。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋によりFv領域の重鎖断片および軽鎖断片を連結することにより形成され、一本鎖ポリペプチドを生じる。

#### 【0051】

特定のエピトープを認識する抗体断片は、既知の技法により生成され得る。例えば、Fab発現ライブラリーは、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片を迅速かつ簡易に同定するために構築され得る(Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281)。

#### 【0052】

さらに、 $TGF\beta$ の活性化を阻止するために、 $TGF\beta$ 前駆体を切断し、活性イソ型に変化させる酵素を抑制してもよい。 $TGF\beta$ がその生物学的効果を示すためには活性化されなくてはならず、酵素は、前駆体タンパク質を切断する必要がある。これらの酵素を、前駆体タンパク質との相互作用が妨げられるように遺伝的に改変し、前駆体タンパク質が活性化された成熟形態へ切断されるのを防止してもよい。これらの酵素の転写または翻訳が、当該技術分野で既知の手段により阻止されてもよい。あるいはこれらの酵素が、当業者に既知の任意の手段により抑制されてもよい。

#### 【0053】

$TGF\beta$ は、セリン／トレオニンキナーゼ受容体に結合し、 $Smad$ タンパク質により細胞内シグナルを伝達する。 $TGF\beta$ により開始されるシグナルを抑制するために、シグナル伝達を妨害してもよい。シグナル伝達を崩壊することにより、 $TGF\beta$ の免疫抑制効果を防止することができる。このことは、当該技術分野において既知の任意の手段であって、 $TGF\beta$ 受容体および $Smad$ タンパク質相互作用を拮抗するか、または妨げる手段により達成され得る。その手段は、 $TGF\beta$ 受容体および $Smad$ タンパク質間の相互作用を妨げるか、または拮抗するタンパク質を発現するように遺伝的に改変された細胞を投与することを含む。あるいは、シグナル伝達経路に沿ったシグナル伝達を防止するために、 $TGF\beta$ 受容体または $Smad$ タンパク質の転写あるいは翻訳が、当該技術分野で既知の任意の手段により改変されてもよい。

#### 【0054】

$NSCLC$ または $SCLC$ を有する患者に、免疫原として $TGF\beta$ を阻害する種を発現するように遺伝的に操作された標的細胞が投与されると、それらは抗腫瘍免疫応答を高めるように作用し、それにより腫瘍保有被験体の生存が延びるであろう。かかる細胞は、患者自身から得られてもよく（自己由来）、またはドナーから得られてもよい（同種異系または異種）。 $NSCLC$ を有する患者に関しては、遺伝的に操作された細胞は、非小細胞肺癌（ $NSCLC$ ）細胞により構成され、それは、 $NSCLC$ から得た細胞であるか、または $NSCLC$ を模倣した細胞である（すなわち、原発性の $NSCLC$ と共有している共通腫瘍抗原または

エプトープを有する)。あるいは、SCLCを有する患者に関しては、遺伝的に操作された細胞は、小細胞肺癌（SCLC）細胞により構成され、それはSCLCから得た細胞であるか、またはSCLCを模倣した細胞である（すなわち、原発性SCLCと共有している共通腫瘍抗原またはエプトープを有する）。

#### 【0055】

自己細胞とは、同一個体から得られる細胞である。同種異系細胞は、種は同一であるが別の個体から得られる細胞であり、したがって細胞が種内遺伝的差異を有する。異種細胞は、異なる種の個体から得られる細胞であり、したがって細胞が種間の抗原差異を有する。

#### 【0056】

一実施形態では、同種異系（または異種）NSCLCまたはSCLC腫瘍細胞系が、免疫原として選択される。肺癌細胞系は、原発腫瘍と共有したエプトープを有することが示されている（Takenoyama et al. 1988）。これらの研究者等は、ヒト肺腺癌細胞系に対して生成されたMHCクラスI制限CTLは、別の腫瘍細胞系に対して明白な細胞障害作用を有することを示した。これらの実験における交差反応性は、抗MHCクラスIおよび抗CD8モノクローナル抗体により阻止され、共有される共通の腫瘍抗原が肺癌細胞間に存在することを示唆している。

#### 【0057】

別の実施形態では、同種異系（または異種）細胞カクテルが、NSCLCまたはSCLCを有する患者における免疫原として使用される。これは、腫瘍抗原提示の総数を増加させるという意味よりはむしろ、2個、3個、4個またはそれ以上の細胞系を使用することができるという意味である。

#### 【0058】

さらに、標的細胞は、TGF $\beta$ 2阻害剤をコードする遺伝的構築物によりトランスフェクトされることにより、TGF $\beta$ 発現性が低下するであろう。腫瘍細胞によりTGF $\beta$ 発現が抑制されると、まずワクチン注射部位で免疫抑制作用の主要原因が除去されるであろう。そして注射した腫瘍細胞に対して誘動される局所免疫応答が、患者の自然腫瘍に対する全身性免疫応答を誘発するであろう。

#### 【0059】



標的細胞は、例えばプラスミド、コスミド、YAC、エレクトロポレーション、リボソーム等の使用を含むがこれらに限定されない形質導入（ウイルスベクターを用いた）またはトランスフェクション手法により、遺伝的構築物を細胞に導入するために、組換えDNA技法を用いてインビトロで遺伝的に操作される。操作された細胞は、例えば、血液循環にて、腹腔内にて、皮内にて、皮下に、肺葉にて、患者に導入され得る。あるいは、細胞は、マトリックス内に組み込まれ、組織移植片の一部として体内に移植され得る。

#### 【0060】

別の実施形態では、標的細胞は、1つまたはそれ以上のサイトカインのコード配列を発現するように操作される。1つの代替法では、1つまたはそれ以上のサイトカインを一重でコードする発現ベクターが標的細胞に導入される。別の代替法では、1つまたはそれ以上のサイトカインおよびTGF $\beta$ 阻害剤を二重でコードする発現ベクターが標的細胞に導入される。さらなる別の代替法では、いくつかの標的細胞のうちの一部は、1つまたはそれ以上のサイトカインのコード配列を発現するように操作され、その他の標的細胞は、TGF $\beta$ 阻害剤を発現するように遺伝的に改変される。免疫抑制TGF $\beta$ を阻害することに加えて、免疫促進剤を同時投与することは、腫瘍細胞に対する被験体の免疫応答を改善し得る。本発明の実施に有用なサイトカインの例としては、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-8、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12、インターロイキン-15、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、腫瘍壊死因子- $\alpha$ 、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、および顆粒球コロニー刺激因子が挙げられる。サイトカイン発現レベルは、抗腫瘍免疫性が被験体において有意な全身毒性をもたらすことのない範囲で上昇することができるように調節されるべきである。

#### 【0061】

投与されるべき標的細胞が非自己細胞である場合、それらは、導入する細胞に

対して宿主免疫応答が発生するのを妨げる既知の技法を用いて投与され得る。例えば、導入する細胞を被包化して導入してもよく、それによりすぐ隣接する細胞外環境との構成成分の交換が可能になる一方で、導入細胞を宿主免疫系が認識するのを不可能にする。

#### 【0062】

NSCLCまたはSCLC細胞の毒性および治療効率は、例えばLD50（集団の50％に対する致死用量）およびED50（集団の50％における治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養液または実験動物における標準的な薬学的手法により決定することができる。毒性と治療効果間の用量比は、治療指数であり、それはLD50/ED50の比として表すことができる。大きな治療指数を示すNSCLCまたはSCLC細胞が好ましい。

#### 【0063】

細胞培養液アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトに使用するための投与量範囲を決定するのに使用され得る。ヒトに投与する量は、毒性が少ないかまたは全くなしで、ED50に含まれる濃度であるのが好ましい。本発明において使用されるNSCLCまたはSCLC細胞の任意の用量に関して、治療上有効な用量は、細胞培養液アッセイから初期に推定することができる。治療上有効な用量が、細胞培養液で決定される場合のIC50（すなわち、症状の最大の半分の抑制を達成する試験物質濃度）に含まれる濃度にするために、動物モデルにて決定されうる。かかる情報を用いて、ヒトにおける有効な用量をより正確に決定することができる。

#### 【0064】

本発明に従って使用するための薬学的組成物は、1つまたはそれ以上の生理学的に許容なキャリアまたは賦形剤を用いて、従来法にて決定され得る。QS-21、Detox-PC、MPL-SE、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERamide、PSC97B、Adjuver、PG-026、GSK-1、GcMAF、B-アレンチン、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、ベータフェクチン、ミョウバン、およびMF59を含む様々な抗原性補強剤（アジュバント）を使用して、免疫学的応

答を増加させ得る (Kim et al. Vaccine 2000, 18:597 およびその中の参考文献を参照)。注射用配合物は、単位投薬形態で、例えばアンプル中または複数用量容器にて提供され得る。

#### 【0065】

本発明はさらに、TGF $\beta$ 阻害剤を発現するように遺伝的に改変された細胞、および治療上許容なキャリアを含む治療用組成物を提供する。本明細書で使用する場合、治療上許容なキャリアは、宿主に対して無毒性の水、分散媒、細胞培地からの培養液、等張剤等を含む任意およびすべての溶媒を含む。適しているのは、約7.0のpHを有する等張緩衝水溶液である。治療用組成物においてかかる媒質または薬剤を使用するのは、当業者に既知である。治療用組成物におけるかかる任意の従来型媒質または薬剤が本発明の遺伝的に改変された細胞に非相容性である場合を除いて、治療用組成物におけるかかる従来型媒質または薬剤使用が意図される。補足の有効成分もまた、組成物に組み込むことができる。

#### 【0066】

本発明の治療用組成物は、それを必要とする動物に投与され得る。したがって、本発明は、免疫応答の必要な動物において免疫応答を誘発する方法を提供し、その方法は、遺伝的に改変されており、免疫学的に有効な量の細胞を動物に投与することを含む。本発明はまた、動物において腫瘍を防止または治療する方法を提供し、その方法は、遺伝的に改変されており、抗腫瘍に有効な量の細胞を動物に投与することを含む。

#### 【0067】

本明細書で使用する「動物」という用語は、ヒトを含むすべての哺乳動物を含む。好ましくは、本発明の動物はヒト被験体である。

#### 【0068】

遺伝的に改変された細胞を投与することによって、動物において誘発される免疫応答は、腫瘍細胞を死滅させることが可能な細胞障害性T細胞により主に媒介される細胞性免疫応答、ならびにB細胞を活性化することが可能であり、したがって抗体の産生を引き起こすヘルパーT細胞により主に媒介される体液性免疫応答を含んでもよい。遺伝的に改変された細胞により誘発される免疫応答型を分析

するために、様々な技法を使用してもよく、それらは、当該技術にて十分に記載されている（例えばColigan et al. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc. (1994)）。

#### 【0069】

本明細書で使用する「腫瘍を防止する」という用語は、腫瘍の発生が防止されるか、または腫瘍の発症が有意に遅延されることを意味する。本明細書で使用する「腫瘍を治療する」という用語は、腫瘍成長が有意に抑制されることを意味し、それは例えば腫瘍体積により反映される。腫瘍体積は、様々な既知の手法、例えば、ダイヤルキャリパーを用いて二次元的測定をすることにより決定され得る。

#### 【0070】

「免疫学的に有効な量」、「抗腫瘍に有効な量」または「腫瘍抑制に有効な量」が示される場合、投与されるべき遺伝的に改変された細胞の正確な量は、患者の年齢、体重、腫瘍の大きさ、感染の程度または転移の程度、および症状における個々の差異を考慮して、医師により決定され得る。通常、遺伝的に改変された対象の細胞を含む治療組成物は、1回の用量につき少なくとも約 $1 \times 10^3$ 細胞～約 $5 \times 10^9$ の細胞を含み、適した方法で投与されるといえる。

#### 【0071】

対象の治療用組成物の投与は、エーロゾル吸入、注射、摂取、輸血、埋没または移植を含む任意の従来型様式で実行されてもよい。適当であれば、本発明の遺伝的に改変された細胞は、皮下（s. c.）、腹腔内（i. p.）、動脈内（i. a.）、静脈内（i. v.）注射により患者に投与される。治療上許容なキャリアは、当業者に既知の技法により殺菌されるべきである。

#### 【0072】

本発明は、以下の具体例によりさらに説明されるが、それはいかなる場合においても本発明の範囲を限定することを意図しない。本発明者等は、以下の実施例において、 $TGF\beta 2$ を $TGF\beta 1$ および $TGF\beta 3$ で置換することを企図する。さらに、本発明者等は、以下の実施例において、NSCLC細胞をSCLC細胞で置換することを企図する。

## 【0073】

## 実施例

臨床試験において、本発明者等は、組織培養研究所にてこれまでに樹立した4つのヒト非小細胞肺癌細胞系を使用する。本発明者等は、これら腫瘍細胞を、それらのTGF $\beta$ 分泌が阻止されるように、研究所にて遺伝子改変する。次に本発明者等は、非小肺癌を有する患者において、ワクチンとして遺伝子的に操作した細胞を使用する。月1回の間隔で4回、TGF $\beta$ アンチセンス遺伝子改変された4種の非自己（同種異系）腫瘍細胞で構成される遺伝子改変ワクチンカクテルを患者に注射する。他のヒトの腫瘍細胞を使用する本発明者等の理論的根拠は、異なるヒトに属する肺腫瘍細胞系が非自己免疫系により認識されるという共通の特性を共有することを示していることにある。治療した患者を、彼等が治療に入った4ヶ月後に評価する。治療の効果がある患者には、彼等の治療効果が増幅されるかどうかを評価するために、さらに4回～12回の注射を行う。

## 【0074】

患者は、3つの別個の群のうちの1つに無作為に割り当てる。ワクチンカクテルは、等数の、4種の照射TGF $\beta$ アンチセンス遺伝子改変NSCLC細胞系のそれぞれから構成される。3つの群において注射した細胞数は、それぞれ $1.25 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、および $5 \times 10^7$ 細胞である。

## 【0075】

応答、腫瘍進行までの時間、および腫瘍を持たない生存を、患者についてモニターし、履歴的対照患者および他の形態の治療を受けた患者と比較する。応答なし、安定な疾患、部分的応答、および完全な応答という分類で、標準的評価基準に従って、患者をモニタリングおよび評価する。この研究の結果を用いて、TGF $\beta$ アンチセンス遺伝子改変腫瘍細胞を単独で用いる、およびIL-2（または他のサイトカイン）遺伝子改変腫瘍細胞との組み合わせを用いる治療の、さらなる臨床試験の実現可能性を評価する。

## 【0076】

## 主要な目的

臨床試験の主要な目的は、遺伝子改変腫瘍細胞ワクチンの用量を増加させるこ

とによって、NSCLCを有する患者の腫瘍応答を誘発する能力を評価することである。

#### 【0077】

##### 研究設計

この研究は、NSCLCを有する患者において、同種異系腫瘍細胞ワクチンの用量が増加することによる免疫化の効果の変化が評価できるように設計される。患者は臨床的応答、免疫抗原性、安全性について観察される。

#### 【0078】

適切な患者に、等数の、4種類の照射同種異系TGF $\beta$ 2アンチセンス遺伝子改変NSCLC細胞系から構成される細胞カクテルを、1月ごとに4回皮内注射する。患者は3つの研究群の1つから任意に抽出する。患者には、それぞれ1、 $2.5 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、または $5 \times 10^7$ 遺伝子改変細胞を与える。

#### 【0079】

入手可能である場合、臨床において指示された手術時に、研究対象の患者から得られる腫瘍試料を使用して、各患者の細胞系を樹立する。次に患者の腫瘍細胞を、遺伝子治療接種法に対する患者の免疫応答をモニタリングする前駆物質分析または細胞障害性アッセイにて使用する。

#### 【0080】

##### ワクチン投与

0、1、2、3および4ヶ月目に、腫瘍細胞ワクチンの皮内注射を患者に行う。これらは、外来患者の設定で投与される。注射する部位は、上肢と下肢で交替にする。ワクチン接種後2時間、患者を病院で観察する。この観察時間中、生命徴候を30分毎に測定する。治療により副作用をほとんど受けない患者は、ワクチン接種の2時間後に解放する。

#### 【0081】

##### 研究手法の概要

以下の表に概要したスケジュールに従って患者にワクチン接種する。他の抗癌治療による介入を必要とするような、手におえないほどの毒性または臨床的に相当な疾患進行が明らかにされない限りは、1ヶ月に1度、4ヶ月間、患者に初期

治療する。腫瘍の病期分類（s t a g i n g）（総合C T／M R I スキャンによって）を、治療の前に、ならびに治療後8、16および28週目、その後は3ヶ月毎に実施する。28週目までは4週毎に、その後は12週毎に、患者に対して免疫応答（体液性応答およびT細胞応答）の連続モニタリングを行う。患者は、研究の間、毒性に関して綿密にモニタリングされる。治療によって有益な効果がみられる患者に、さらに、4～8週間毎に12回のワクチン接種をする（全16回のワクチン接種）。

#### 【0082】

##### 停止規則

ワクチン接種した後の腫瘍応答が初期の腫瘍進行期間に続く可能性がある場合であって、8週目に非臨床的に相当な腫瘍進行があっても患者に研究を続けることが可能である。かかる患者は、16週目に、さらなる腫瘍進行を示してはならない（8週目と比較して16週目にて最大25%増加）。16週目に依然として進行性疾患を示す（8週目と比較して）患者は、研究から外される。

#### 【0083】

##### 【表1】

1ヶ月間の治療計画の概要

手法	スクリーン	1 日目	2 日目	8 日目	29/1 日目
インフォームドコンセント	X				
経過、検査 <sup>1</sup>	X [2]	X			X
電話連絡			X		
生命徴候、体重、P S	X [2]	X		X	X
有害事象	X [2]	X		X	X
共同投薬	X [2]	X		X	X
各分画におけるC B C	X [1]	X		X	X
電解質パネル	X [1]	X			X
代謝パネル	X [2]	X			X
腫瘍の病期分類 <sup>2</sup>	X [4]				
接種部位の生体組織検査				X	
体液性免疫 <sup>3</sup>	X [2]				X
細胞性免疫 <sup>3</sup>	X [2]				X
ワクチン投与 <sup>4</sup>		X			X

〔X〕：1日目より前のX週以内に。

<sup>1</sup> 治療中は一ヶ月に一度、フォローアップでは3ヶ月毎に一度。

<sup>2</sup> 8、16、28週目に、その後12週毎に繰り返す。

<sup>3</sup> 4、8、12、16、20、24、28週目に、その後12週毎に繰り返す。

<sup>4</sup> 1、4、8、12週目に投与。応答している患者に関しては連続投与可能。

## 【0084】

### 手法の定義

電話連絡：研究看護師による電話により患者と連絡して、炎症、疼痛または局所注射部位でのかゆみの度合いを評価する

各分画におけるC B C：W B C、H C T、H G B、血小板計数、好中球%、白血球%、単球%

電解質パネル：ナトリウム、カリウム、塩化物、二酸化炭素、B U N、クレアチニン、グルコース

代謝パネル：カルシウム、リン、A S T、A L T、アルカリホスファターゼ、ビリルビン、尿酸、アルブミン、タンパク質

腫瘍病期分類：物理的検査、X線、適切な場合にはC T/M R I。すべての病期分類は、基準にて使用された方法と同じ方法で腫瘍を評価するべきである



接種部位の生体組織検査：炎症性ワクチン接種部位の周辺にて、または炎症がない場合には、ワクチン接種部位を含めて行われるパンチ皮膚生体組織検査

体液性免疫：血清抗腫瘍力価

細胞性免疫：CD3、CD4、CD8、CD16、CD20、およびCD68を含む末梢血B細胞およびT細胞サブセット（十分な細胞が入手可能である場合）の免疫表現型タイピング

定量的（半定量的）なNK活性（非特異的殺傷）、LAK活性（アロ殺傷）によるPBCサイトカインプロファイルを測定

#### 【0085】

臨床試験対象基準

- ・インフォームドコンセントに署名したもの
- ・18歳以上
- ・測定可能な疾患および推定体積125ccを有する治癒不可能なNSCLCを組織学的に確認されたもの
- ・一般状態（ECOG） 2以下・絶対顆粒球数  $1,500/\text{mm}^3$
- ・血小板数  $100,000/\text{mm}^3$
- ・総ビリルビン  $2\text{mg}/\text{dL}$ 以下
- ・ASTおよびALT 正常の上限の2倍以下
- ・クレアチニン  $1.5\text{mg}/\text{dL}$ 以下

#### 【0086】

臨床試験対象除外基準

- ・同時全身ステロイド 1日当たりのプレドニゾンが $20\text{mg}$ より多い
- ・事前脾摘出
- ・手術、化学療法、放射線療法、ステロイド療法または免疫療法 研究に入る4週間未満
- ・治療して、2ヶ月間安定である場合を除いて、脳転移または髄膜リンパ腫症
- ・既知のHIV陽性
- ・研究者の考えによるとプロトコルの対象を傷つけるであろう重篤な非悪性疾患（例えば、うつ血性心不全、または活性非制御細菌、ウイルスまたは真菌感染）

、あるいは他の症状

- ・ 2年間以上寛解状態にある場合を除いて、事前悪性疾患（皮膚の非黒色腫瘍腫を除く）
- ・ 研究に入る前の30日以内に治験薬で治療
- ・ プロトコルを遵守することを妨害するであろう精神医学的障害の履歴
- ・ 妊婦または育児をしている女性、あるいは生殖能力を有する場合、避妊を実施することへの拒絶

#### 【0087】

##### 研究の遂行

本研究は、臨床試験実施に関する基準であるヘルシンキ宣言および米国21CFRパート50・ヒト被験者の保護、およびパート56・施設内治験審査委員会に従って遂行される。研究に関して書面による日付付きのインフォームドコンセントを、プロトコルに明記した手法を実施する前に、すべての患者から得る。署名後、患者のインフォームドコンセントのコピーを患者に付与する。患者をこの研究に登録する前に、適切な施設内治験審査委員会からこの研究の承認を得る。同意の書式は、患者予定者が完全に理解できる言語で行う。同意したことは、患者自身の日付付き署名により、あるいは患者の同意を記録する個々の立会人の署名により証明される。

#### 【0088】

##### 腫瘍応答

患者は、CT/MRIおよび物理的検査により評価される。臨床試験に関する標準的な結果の基準（完全な応答（CR）、部分的応答（PR）、安定した疾患（SD）および進行性疾患（PD））を用いて応答を記録する。治療に対して応答（PRまたはCR）があった場合は、いかなる場合も、少なくとも4週間を隔てて、2つの確証的病期分類をしなければならない。

##### 完全な応答

- ・ 少なくとも4週間、すべての測定可能な疾患の解消
- ・ 少なくとも4週間、すべての評価可能な疾患の解消
- ・ 新たな病巣なし（測定可能または評価可能）

## 部分的応答

- ・少なくとも4週間、すべての測定可能な病巣の産物の総計のうち、少なくとも50%が減少
- ・少なくとも4週間、評価可能な疾患の自覚的改善
- ・新たな病巣なし（測定可能または評価可能）

## 安定した疾患

- ・すべての測定可能な病巣の産物の総計のうち、50%未満が減少、かつ25%未満が増加
- ・新たな病巣なし（測定可能または評価可能なもの）

## 進行性疾患

- ・すべての測定可能な病巣の産物の総計のうち、25%超が増加、または新たな病巣（測定可能または評価可能なもの）

## 【0089】

## 免疫応答の評価

## 体液性免疫応答の評価

体液性抗腫瘍免疫応答は、固相酵素免疫検定法（ELISA）を用いて、ワクチン接種する細胞系に対する反応性に関して、治療前および治療後の血清の力価を比較することにより評価される。簡潔に述べると、 $10^5$ 個の標的細胞を、96ウェルインキュベーターチャンバー（V and P Enterprises, La Jolla, CA）の濾紙ディスク上に固定化し、続いて試験血清とともに30分間インキュベートする。プレートを洗浄し、続いて酵素結合抗ヒト免疫グロブリン（Ig）とともにインキュベートする。プレートを再び洗浄し、酵素基質を添加し、ELISA測定器で各ウェルの吸光度を測定することにより、結合を定量化する。

## 【0090】

## 細胞性免疫応答の評価

## 免疫表現型タイピング

標準的な免疫蛍光フローサイトメトリーアッセイを行い、患者の治療前および治療後の免疫エフェクター細胞プロファイルを評価する。T細胞（CD3、CD4、CD8）、ナチュラルキラー細胞（CD16）、およびB細胞（CD20）

に対するモノクローナル抗体と反応するエフェクター細胞の亜集団のパーセントを、治療前および治療後の末梢血リンパ球群にて測定し、他の基準により測定した患者の応答と相関させる。簡潔に述べると、フィコール・ハイパークの精製単核細胞を、一次抗体とともに室温にて1時間インキュベートし、洗浄し、続いて蛍光色素結合二次抗体とともにインキュベートする。細胞を洗浄し、固定して、陽性細胞のパーセントを、フローサイトメーターを用いて決定する。一次抗体の代わりにイソ型とインキュベートした対照抗体との細胞のインキュベーションは、陰性対照として役立つ。

#### 【0091】

##### ナチュラルキラー（NK）活性

NK活性は、標的としてNK感受性細胞系K562を用いた標準的クロム遊離試験を用いて分析される。簡潔に述べると、K562細胞を、 $^{51}\text{Cr}$ と37℃にて45分間インキュベートすることにより標識する。標的細胞を広範囲に洗浄した後、エフェクター細胞：標的細胞の比を100：1～3：1の範囲として、 $5 \times 10^3$ 個のK562を、治療前および治療後PBMCとともに、37℃にて4時間インキュベートする。次に、細胞を遠心分離し、 $\gamma$ カウンターを用いて $^{51}\text{Cr}$ 遊離量を測定する。特定細胞溶解パーセントは、以下の式：（実験（experimental）cpm－背景（background）cpm）／（全（total）cpm－背景（background）cpm） $\times 100$ を用いて決定される。

#### 【0092】

##### LAK活性

LAK活性は、標的としてLAK感受性細胞系DAUDIを用いて、上述のようにクロム遊離アッセイにより決定される。

#### 【0093】

##### 治療前および治療後のリンパ球のサイトカインプロファイル

患者のPBMCのサイトカインプロファイルは、半定量的PCRアッセイにより確定される。患者の治療前および治療後の精製単核細胞からRNAを抽出し、それを用いて、製造業者の推奨に従ってInvitrogen(サンディエゴ，カリフォル

ニア)のcDNAサイクルキットにより、第1鎖cDNAを合成する。次に、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、GM-CSF、 $\gamma$ -INF、TNF- $\alpha$ 等の検出のために、種々のプライマーセットを用いたPCRアッセイにて、第1鎖cDNAを鋳型として使用する。定量化を達成するために、ポリメラーゼ連鎖反応は、15～18サイクルに制限される。内部対照として、かつ産物の定量化を促進するために、既知濃度の対照RNAをcDNA合成開始前に各試料に添加する。次に、対照配列に関する特定のプライマーをポリメラーゼ連鎖反応に添加する。患者試料のサイトカインプロファイルは、患者のPCR産物を定量化し、それらを対照PCR産物と比較することにより確定される。

#### 【0094】

##### 免疫化部位の皮膚生体組織検査

標準的なヘマトキシリンおよびエオシン染色、ならびに造血細胞サブセットに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的方法を用いて、免疫化部位における皮膚生体組織検査にて観察される免疫浸潤物を解析する。T細胞(CD3、CD4、CD8)、ナチュラルキラー細胞(CD16)およびB細胞(CD20)に対するモノクローナル抗体をこれらの研究のために利用する。簡潔に述べると、免疫組織化学的研究のために、凍結切片を冷アセトン中で固定した後、一次抗体とともに室温にて一時間インキュベートする。切片を洗浄し、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体とともにインキュベートした後、適切な色素原基質で切片を染色し、光学顕微鏡法により検査する。一次抗体の代わりにイソ型の対照抗体との切片のインキュベーションは、陰性対照として役立つ。

#### 【0095】

##### 薬物情報

##### 臨床的処方

ワクチンは、バイアル1本あたり少なくとも $2.0 \times 10^8$ 細胞を含有する凍結バイアルにて提供される。

##### 薬剤師指示書

##### 非希釈物質

バイアル容量： 1 m l

外観： 濁り液

保管： - 1 7 6 ℃（液体窒素）

危険： 凍結バイアルは、破壊されないのであれば危険とみなされない。バイアルは、1 0 % ジメチルスルホキシドおよび5 0 % ウシ胎児血清を含む混合物中にて、凍結された細胞を含有する。

取り扱い： 凍結バイアルは、破壊されないのであれば安全性を害するものとみなされない。破壊されたバイアルは、細胞障害性薬剤に関するバイオハザード処置に従って破棄されるべきである。

#### 希釈物質

調製： 患者に注射する前に、凍結バイアルをバイオセーフティフードにて解凍し、血清含有媒質で2回、乳酸加リンガー液で4回洗浄する。次に細胞を計数し、2 5 0 ~ 4 0 0  $\mu$  l の容量で、1回の注射当たりの適切な細胞数に調節する。細胞懸濁液をキャップ付きの1 m L 注射器に用意する。

薬剤濃度： 2 5 0 ~ 4 0 0  $\mu$  l の容量中に、1回の注射当たり1 . 2 5  $\times 10^7$ 、2 . 5  $\times 10^7$ 、または5  $\times 10^7$  細胞

希釈液： 乳酸加リンガー液

投与経路： 皮内注射

#### 保管

凍結した未開封のバイアル中で、- 1 7 6 ℃（液体窒素）で保管する。

#### 【0 0 9 6】

##### データ評価

##### 統計学および推定試料サイズ

2 7 ~ 7 5 人の総数の患者を登録する。この研究は2段階で成る。3つの治療手段それぞれにまず9人の患者を収集する。最初の9人の患者に応答が見られない場合、その治療手段には、それ以上の患者を収集しない。最初の9人の患者の中で少なくとも1人に応答が観察される場合、さらに1 6 人の患者をその治療手段に収集し、1つの治療手段当たり総計2 5 人の患者とする。

#### 【0 0 9 7】

患者は、少なくとも2回のワクチン接種を受け、8週目に2回目の腫瘍病期分類を受けた場合、腫瘍応答に関して評価対象であるとみなされる。

【0098】

患者は、少なくとも1回のワクチン接種を受け、4週目に免疫分析を受けた場合、免疫応答に関して評価対象であるとみなされる。

【0099】

1回目のワクチン接種後に、患者が毒性に関して適格であることを確認する。

【0100】

結果の報告

応答の割合は、評価可能であると決定された患者における記述統計、ならびにCR、PR、SDおよびPDの報告の割合を用いて報告される。初期治療後における腫瘍進行の時間は、CRまたはPRのいずれかを受けている患者に関して決定される。

【0101】

二次的項目としては、免疫応答、応答の持続期間、および安全性が挙げられる。これらの割合もまた、記述統計を用いて報告される。安全性は、所定の有害事象を受けている患者のパーセントとして報告される。応答が観察される集団に関しては、腫瘍進行の平均時間が、カプラン・メイアー統計学を用いて報告される。

【0102】

非改変NSCLC細胞系

このワクチンの生産に使用される8個のNSCLC細胞系のうち7個は、American Tissue Cell Culture (ATTC)から購入される樹立細胞系である。ヒト扁平上皮NSCLC細胞系であるRh-2は、Lee et al., J. Immunology 152:3222, 1994; Huang et al., Cancer Research 55:3847, 1995; Huang et al., J. Immunology 157:5512, 1996; およびHuang et al., Cancer Research 58: 1208, 1998に従って、1994年にUCLAにあるDr. Steven Dubinettの研究室にて外科的切除検体から樹立されており、公的に入手可能である。

【0103】

p C H E K / H B A 2 : T G F  $\beta$  2 アンチセンスプラスミド  
 プラスミドを含有するヒト T G F  $\beta$  2 アンチセンスを構築するために使用される  
 p C H E K ベクターは、p C E P 4 ベクター (Invitrogen, サンディエゴ, カリ  
 フォルニア) から得た。それは、遺伝的サブクローニングを促進するためにわず  
 かに改変された。結果的に生じるキャリアベクターは p C H E K である。遺伝的  
 サブクローニングを用いて、T G F  $\beta$  2 アンチセンス遺伝子断片 (H B A 2) を  
 p C H E K に挿入した。一定分量の p C H E K / H B A 2 プラスミドを制限酵素  
 分析により検査して、1) T G F  $\beta$  2 アンチセンスがクローニングされたキャリ  
 アベクターの同定、および 2) T G F  $\beta$  2 アンチセンスを挿入することは適切な  
 手段であることを確実にする。

#### 【0104】

試験限界：14個のエンドヌクレアーゼ：A p a I、B a m H I、B g I I I  
 、C l a I、E c o R V、H i n d I I I、H p a I、N o t I、N r u I、P  
 s t I、S a I I、S a c I I、S c a I および X b a I を用いた一連の制限消  
 化後の D N A 断片と、予想 D N A 断片サイズとの完全な相同性

#### 【0105】

結果：これらの制限消化物により得られる D N A 断片を観察したところ、p C  
 H E K / H B A 2 プラスミドの予想断片サイズに相当した。結論として、サブク  
 ローニングに使用されるベクターは、適切であり、T G F  $\beta$  2 アンチセンス遺伝  
 子断片を挿入することは、適切な手段である。

#### 【0106】

これらの制限消化物の予想断片は、以下の通りである：

A p a I	4 6 0 4 b p	3 3 0 9 b p	1 9 5 7 b p	8 7 4 b p
	2 1 9 b p			
B a m H I	1 0 9 6 3 b p			
B g I I I	1 0 2 1 0 b p	7 5 3 b p		
C l a I	1 0 9 6 3 b p			
E c o R V	1 0 9 6 3 b p			
H i n d I I I	7 4 5 0 b p	2 7 8 7 b p	6 3 6 b p	



Hpa I	1 0 2 5 1 b p	7 1 2 b p
Not I	1 0 9 6 3 b p	
Nru I	5 7 1 6 b p	5 2 4 7 b p
Pst I	7 5 7 3 b p	1 4 9 4 b p
		1 2 7 7 b p
		6 1 9 b p
Sa I I	8 7 3 8 b p	2 2 2 5 b p
Sac I I	5 3 4 7 b p	3 3 4 0 b p
		2 2 7 6 b p
Sca I	8 0 2 1 b p	1 9 1 5 b p
		1 0 2 7 b p
Xba I	9 5 7 9 b p	1 3 8 4 b p

## 【0107】

TGF $\beta$  2 アンチセンス挿入物

TGF $\beta$  2 アンチセンス断片の正確な配列および方向性をさらに確実にするために、ABI-310 遺伝子アナライザー (Perkin Elmer, Foster City, カリフォルニア) を用いた配列分析により、挿入物を試験した。

## 【0108】

試験限界：プラスミド挿入物と TGF $\beta$  2 アンチセンス間の完全な相同性

## 【0109】

結果：得られた配列決定の結果から、pCHEKベクターにおけるヒトTGF $\beta$  2 断片の存在を確認した。これらの結果により、挿入物が適切であることも確認した。pCHEK/HBA2ベクターの構築に使用されるヒトTGF $\beta$  2 断片の配列、およびベクター中のそのフランキング領域は以下のようなものである。小文字は、ヒトTGF $\beta$  2 断片に隣接する2つのベクター配列を表す。

## 【0110】

t g t c t g g a t c   c g g c c t t g c c   g g c c t c g a (配列番号  
2) ———挿入物に隣接するベクター配列———

ヒトTGF $\beta$  2 の塩基対5

(配列番号1) ———ヒトTGF $\beta$  2 の塩基対935———a g c t t g c t  
a g c a g c t g g t   a c c c a g c t (配列番号3) ———挿入物に隣接する  
ベクター配列

## 【0111】

### 遺伝子改変NSCLC細胞系

トランスフェクトした後、各遺伝子改変細胞系のクローンを、PCRにより、pCHK/HBA2ベクターの存在に関して試験した。pCHK/HBA2に関して陽性の結果を示したクローンのみ、さらなる分析のために選ばれた。

#### 【0112】

結果：試験した8個の細胞系のうち7個からのコロニーは、TGF $\beta$ 2アンチセンストランスフェクションに関して陽性であった。細胞系NCI-H-292は陰性であった。

#### 【0113】

### TGF $\beta$ 2のダウンレギュレーション

トランスフェクトした後、各遺伝子改変細胞系のクローンを、固相酵素免疫検定法(ELISA)によりTGF $\beta$ 2のダウンレギュレーションに関して試験し、改変されていない親細胞系と比較した。簡潔に述べると、TGF $\beta$ 2アンチセンス遺伝子改変細胞培養液の血清を含まない上清を24時間後に収集し、ELISAキット(Genzyme, Cambridge, MASS)を用いたTGF $\beta$ 2分泌レベルに関して、三重反復試験にてアッセイした。製造業者の推奨に従って、ヒトTGF $\beta$ 2を、抗ヒトTGF $\beta$ 2モノクローナル抗体により捕獲し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトTGF $\beta$ 2抗血清との反応により定量化した。色素原基質との酵素反応を展開し、マイクロELISAプレート読取り器上で吸光度を読取ることにより、定量化がなされた。既知濃度のTGF $\beta$ 2を表す標準TGF $\beta$ 2曲線は、TGF $\beta$ 2アンチセンス遺伝子改変細胞が分泌するTGF $\beta$ 2の定量化を可能した。

#### 【0114】

未改変腫瘍細胞に関する試験限界：TGF $\beta$ 2の分泌量が24時間当たりの、かつ $10^6$ 細胞当たり、少なくとも200 pg

#### 【0115】

ワクチン用遺伝子改変腫瘍細胞系に関する試験限界：未改変親細胞に対して、TGF $\beta$ 2産生を少なくとも35%低減。この試験限界は、Lee et al., J. Immunology 152:3222, 1994に従って、ワクチン接種療法によって腫瘍細胞の免疫原

性が高まることを実証する。

# 【0116】

治療開始の約3～4日前に、一定分量の各遺伝子改変細胞系を、TGF $\beta$ 2抑制に関して再試験する。同じ試験限界が適用される。

# 【0117】

【表2】

細胞系	肺癌腫	未変更TGF $\beta$ 2レベル (ng/10 <sup>6</sup> 細胞/24 時間)	遺伝子変更TGF $\beta$ 2レベル (ng/10 <sup>6</sup> 細胞/24 時間)	TGF $\beta$ 2のダウンレギュレーション%
NCI-H-292	粘膜表皮	未検出	未検出	未検出
NCI-H-460	大細胞	0.67	0.12	82%
NCI-H-520	扁平上皮	2.27	1.43	37%
NCI-H-596	腺扁平上皮	1.5	2.6	-73%
NCI-H-661	大細胞	13.1	12.96	1%
SK-LU-1	腺癌	3.58	1.36	62%
SK-MES-1	扁平上皮	1.2	1.36	-13%
Rh-2	扁平上皮	1.16	0.1	91%

# 【0118】

選択された4種の細胞系は、NCI-H-460、NCI-H-520、SK-LU-1およびRh-2であった。本発明者等の手法では、TGF $\beta$ 2アンチセンス遺伝子改変は、腫瘍細胞における内因性のTGF $\beta$ 2発現の37～91%を阻止した。これらの細胞におけるTGF $\beta$ 2発現の抑制は、培養液にて6～9ヶ月の間続いた。

# 【0119】

## 細胞密度

患者にワクチンを接種する前に、細胞密度を各細胞系に関して評価する。使用される各細胞系の一定分量を、血球計算器を用いて計数して、細胞濃度を確認する。等数の各遺伝子改変細胞系を、この研究にて試験されるべき3つの用量にあわせて混合する（それぞれ $1.25 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、および $5 \times 10^6$ 全細胞）

## 【0120】

## 細胞生存度

患者にワクチンを接種する前に、細胞生存もまた、各細胞系に関して評価する。免疫化に用いられる細胞の生存度は、トリパンブルー排除法により評価される。トリパンブルー色素は、形質（プラスマ）膜の完全性の尺度である。生存可能な細胞は、形質膜の完全性を維持し、したがって色素を排除する。死滅細胞は、膜の完全性を失っており、色素の取り込みが可能であり、したがって青く見える。一定分量の各細胞系を試験し、血球計算器にて細胞を計数する。生存可能な「青くない」細胞のパーセントが決定される。

## 【0121】

試験限界：治療に使用する TGF $\beta$  2 アンチセンス遺伝子改変腫瘍細胞の生存度は、50%よりも高くなくてはならない。

## 【0122】

## クローン原性

安全性を確実にするために、患者ワクチン接種に使用されるべき遺伝子改変腫瘍細胞系すべてが、注射前に照射されなくてはならない。これは、腫瘍細胞の成長および複製を防止するためである。細胞は、10,000 cGy の線量で、使用前に照射される。この照射線量の選択は、Massachusetts General Hospitalにある Radiation Oncology の長である Dr. Herman Suit との論議に基づくものである。これは、遺伝子改変腫瘍細胞の、増殖および腫瘍形成を不可能にするのに十分であって最低の照射線量であった。トランスフェクトした細胞にとって考え得る最低の照射線量を使用して、TGF $\beta$  2 アンチセンス転写のレベルおよび持続期間を最適化することが望ましい。さらに、本発明者等は、ヒト NSCLC、神経膠腫、結腸癌、および膵臓癌腫細胞系を含む種々の組織源の培養腫瘍細胞に関して、本発明者等の研究所にてこの照射線量について試験し、種々の組織源の培養腫瘍細胞によるコロニー形成を完全に停止することが可能であることを実証した。

## 【0123】

未改変および遺伝子改変ヒト NSCLC 細胞系の試料を、10,000 cGy

で照射した。次に、照射細胞を、T-225 フラスコにて培養し、コロニー形成について観察した。コロニーとは、16個の成長細胞のクラスターと定義した。以下の表に示すように、4～6週の観察期間の間、照射細胞の培養液にてコロニーは形成しなかった。対照的に、非照射細胞の対照培養液においてはすべてが、10～14後に集密状態になった。照射細胞の培養液において、観察開始の約2週間後に、細胞死が起こった。

【0124】

【表3】

主なNSCLC細胞培養に対する照射の効果

腫瘍細胞	照射線量 (Gy s)	5週目のコロニー数
対照培養	なし	10～14日後に集密
NCI-H-292	10,000	なし
NCI-H-460	10,000	なし
NCI-H-520	10,000	なし
NCI-H-596	10,000	なし
NCI-H-661	10,000	なし
SK-Lu-1	10,000	なし
SK-MES-1	10,000	なし
Rh-2	10,000	なし

【0125】

ワクチン接種前に、一定分量の各遺伝子改変細胞系を解凍し、各ロットが患者の注射用に安全であると考えられるまでの4～6週間、培養液におけるコロニー形成について試験する。

【0126】

試験限界：コロニー形成なし

【0127】

細胞系の無菌性

細胞の製造業者ATCCから購入した各未改変細胞系に関して、無菌性試験を実施した。

【0128】

さらに、一定分量の各細胞系をMolecular Diagnostics Associatesに送付し、以下のウイルス剤の存在に関してアッセイした：

H I V 1 & 2	H B V	C M V
H H - 6	H C V	H T L V
E B V	外来ウイルス	

## 【0129】

結果：8個の未改変マスター細胞系すべてが、細菌、真菌およびウイルスの存在に関して陰性であることがわかった。

## 【0130】

インビトロ (i n v i t r o) での成長および操作中、各細胞系は、細菌、真菌およびマイコプラズマ感染に関してルーチンで試験した。他の細胞による汚染を回避するために、研究室での操作中、培養液は、完全に個別に処理した。最終的に、治療日に、接種試料をグラム染色により再試験する。すべての無菌性試験を通過した細胞のみが治療に使用される。

## 【0131】

試験限界は、細菌、マイコプラズマまたは真菌感染なしである。

## 【0132】

臨床等級の p C H E K / H B A 2 プラスミド

p C H E K / H B A 2 プラスミドの予備解析後、Qiagen Corporationにより最適化された、Birnboim およびDolyのアルカリ溶解法 (Birnboim and Doly, 1979) により、細菌培養液からD N A ストックを調製し、Qiagen EndoFree Gigaプレッパカラムにて精製した。すべての工程は、バイオセーフティフローフード中で、A R T バリアチップを用いて、無菌条件下にて行った。一定分量のプラスミドD N A を取り出して、無菌性に関して試験した。簡潔に述べると、プラスミドD N A 20  $\mu$  l を用いて、それぞれが抗生物質を含まないL B 5 m l を含有する、4つの培養チューブに接種した。培養液を、37℃で5日間インキュベートした。

## 【0133】

試験限界：細菌成長なし

## 【0134】

結果：コロニーは観察されず、調製した臨床等級のD N A の無菌性を確認した

## 【0135】

## 製造およびパッケージング手法の簡単な概説

8種の樹立NSCLC細胞系を、American Tissue Cell Culture(ATCC)または他から購入し、膨張させて、未改変マスター細胞バンク(unMCB)として凍結した。各細胞系は、無菌性(細菌およびウイルス汚染)、クローン原性およびTGF $\beta$ 2発現に関して試験をした。一定分量の各系を解凍し、標準的な技法を用いて、TGF $\beta$ 2アンチセンス導入遺伝子を含むベクターであるpCHEK/HBA2でトランスフェクトした。遺伝子改変細胞系をハイグロマイシン選択のもと培養液で膨張させ、治療用途および試験に十分な数に成長させた。次に膨張した細胞系を、TGF $\beta$ 2発現のダウンレギュレーションおよび無菌性に関してアッセイした。TGF $\beta$ 2発現に関して適切なダウンレギュレーションを示し、かつ無菌性を示す4つのNSCLC細胞系：NCI-H-460、NCI-H-520、SK-LU-1およびRh-2について同定した。これらの細胞系を、(1) 遺伝子改変マスター細胞バンク(gmMCB)および(2) 遺伝子改変作業用細胞バンク(gmWCB)として、一定分量で凍結し、液体窒素中に保管した。使用前に、一定分量のこれらの4つの細胞系を、gmWCBから解凍して、10,000Gyで照射し、無菌性、クローン原性およびTGF $\beta$ 2ダウンレギュレーションに関して再試験した。すべての試験限界を通過した細胞ロットのみが、ワクチン調製に使用することが可能である。次に、注射日に、使用可能のgmWCBロットそれぞれから十分な細胞を解凍し、照射して、等数で混合する。患者へのワクチン接種前に、接種試料を、細菌汚染に関して試験する。汚染が検出されない場合、ワクチン接種に取りかかることができる。

## 【0136】

## 組織獲得

以下の8個の樹立NSCLC細胞系は、American Type Culture Collection(ATCC)またはその他から得られ、培養液にて膨張させ、未改変マスター細胞バンク(全8個のunMCB)として凍結した。10%のFBS、25mMのHepes、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、2.5 $\mu$ g/mlのフンギゾン、50 $\mu$ g/mlの硫酸ゲンタマイシン、 $10^{-4}$ Mの $\alpha$ -チオー

グリセロールおよび非必須アミノ酸を補充したIMDMにて、細胞系を培養した。各細胞系は、1バイアルにつき $10^8$ 細胞超であって、100バイアル分を含む1つのロットとして凍結した。各細胞系は、無菌性およびTGF $\beta$ 2発現に関して試験した。以下の細胞系を使用した：

- ・NCI-H-292
- ・NCI-H-460
- ・NCI-H-520
- ・NCI-H-596
- ・NCI-H-661
- ・SK-LU-1
- ・SK-MES-1
- ・Rh-2

#### 【0137】

ヒトTGF $\beta$ 2アンチセンス発現プラスミドの構築

pCHEK/HBA2プラスミドの説明

ヒトTGF $\beta$ 2アンチセンス発現プラスミド（pCHEK/HBA2）を構築するために使用されるpCHEKベクターは、pCEP4ベクター（Invitrogen, サンディエゴ, カリフォルニア）から得られるので、癌細胞の遺伝子改変を容易にし、安全性の懸念を排除した。pCHEKベクターは、以下を除くすべての領域でpCEP4ベクターと同一である：

- ・アンピシリン耐性の代わりに、カナマイシン耐性が、pCHEKベクターには組み込まれている。
- ・pCHEKベクターでは、SV-40初期プロモーター、続くイントロンから構成されるDNAカセットユニットが、ハイグロマイシン耐性遺伝子の発現を駆動する。SV-40プロモーター／イントロンユニットの組込みは、ハイグロマイシン耐性遺伝子の発現を増加させて、培養液中の遺伝子改変細胞の選択を容易にするためである。

#### 【0138】

pCHEK/HBA2プラスミドは、CMVプロモーターを利用して、アンチ



センス方向性で、930塩基対ヒトTGF $\beta$ 2断片の発現を駆動する。TGF $\beta$ 2アンチセンス断片は、CMVプロモーターに隣接してかつその制御下にて逆方向性で連結されるヒトTGF $\beta$ 2のcDNA分子の5'末端の塩基6～935によって構成される。pCHEKベクターはまた、SV-40初期プロモーターにより駆動されるハイグロマイシン耐性遺伝子、エプスタイン・バーウイルス複製起点、およびエプスタイン・バーウイルス核関連タンパク質1 (EBNA-1)のための遺伝子を含む。さらに、このベクターは、DNA製造中のベクターを含む細菌の選択のためのColE1起点およびカナマイシン耐性遺伝子を含む。

【0139】

【表4】

pCHEKベクタードメイン

ドメイン	ドメイン含有断片
SV-40ポリAシグナル	1～405
複数クローニング部位	406～463
CMVプロモーター	467～1311
TKポリAシグナル	1312～1843
ハイグロマイシン	1844～2899
イントロン	2900～3233
SV-40初期プロモーター	3234～3602
ColE1起点&カナマイシン耐性	3603～5188
EBNA-1	5189～7789
エプスタイン・バー複製起点 (OriP)	7790～1046

【0140】

TGF $\beta$ 2アンチセンスのpCHEKベクターへのサブクローニング

TGF $\beta$ 2単離

pCHEK/HBA2プラスミドを構築するために、本発明者等はまず、pCEP4/HBA2、シャトルベクターを構築した。簡潔に述べると、ヒトTGF $\beta$ 2遺伝子を含むプラスミドpPC21 (Dr.Purchioから公的に入手可能)を、EcoRIで完全に消化させた。EcoRI末端を、反応条件をそれぞれ250 $\mu$ MのdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPに調節し、3ユニットのクレノー酵素を添加して、反応を開始することにより平滑末端化した。反応は、37℃にて30分間行った。次に、反応容量をTEで100 $\mu$ lに調節し、

フェノール／クロロホルムで抽出をした。DNAをイソプロパノール沈殿して、70%エタノールですすいだ。930塩基対TGF $\beta$ 2断片(HBA2)が、HindIII消化によりベクターから放出された。1%アガロースゲルの電気泳動後、930bp TGF $\beta$ 2断片を含有するゲルスライスを切除し、ルーチンな酸化シリカ(ガラス粉末)法によりDNA断片を抽出した。これにより、TGF $\beta$ 2 DNAをpCEP4ベクターに連結させる準備ができた。

#### 【0141】

##### pCEP4/HBA2シャトルベクター構築

XhoI制限酵素で消化することにより、pCEP4ベクターを調製し、上述のようにクレノー反応により平滑末端にした。フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿後、ベクターをHindIIIで消化して、上述のようにアガロースゲル電気泳動／ガラス粉末法により精製した。

#### 【0142】

930塩基対ヒトTGF $\beta$ 2断片を、アンチセンス方向性となるようにpCEP4ベクターにサブクローニングした。大腸菌の形質転換後、pCEP4/HBA2のDNAを、数個のアンピシリン耐性形質転換細菌コロニーから調製した。これらのコロニーからの単離されたDNAは、制限酵素解析を行い、pCEP4/HBA2と命名した1つのクローンを選択し、臨床用プラスミドpCHEK/HBA2の構築のために使用した。

#### 【0143】

##### pCHEK/HBA2発現プラスミド構築

簡潔に述べると、pCEP4/HBA2のDNAを、制限酵素KpnIおよびBamHIで消化して、930bp TGFアンチセンス挿入断片をアガロースゲル電気泳動により精製した。次に、挿入物をKpnIおよびBamHIで消化したpCHEKベクターに連結し、細菌を形質転換するのに使用した。一晚の培養のカナマイシン選択後、pCHEK/HBA2のDNAを数個のクローンから単離して、制限酵素解析を行い、同定を行った。TGF $\beta$ 2アンチセンス断片の正確な配列および方向性をさらに確認するために、ABI-310遺伝子アナライザー(Perkin Elmer, Foster City, CA)を用いた配列分析により、挿入物を試験

した。

#### 【0144】

臨床等級のpCHEK/HBA2プラスミドの製造

予備解析をした後、pCHEK/HBA2プラスミドを含有する1つの細菌コロニーを、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含有するLuria-Bertani培地（LB培地）寒天プレート上で画線培養した。37℃でインキュベートした後、単一の細菌コロニーを、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含有するLBブロス5mlに接種し、振盪細菌インキュベーター中で37℃にて一晩成長させた。この一晩の培養液を、細菌を含むプラスミドの50ml培養液に接種した。50mlの細菌培養液を一晩インキュベートし、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを加えたLBを2リッター含むフラスコに接種した。これを、37℃にて一晩成長させた。

#### 【0145】

Qiagen Corporationにより最適化されるようなBirnboim and Dolyのアルカリ溶解法により、細菌培養液からDNAを調製し(Birnboim and Doly, 1979)、Qiagen EndoFree Gigaプレップカラムにて精製した。すべての工程は、バイオセーフティフローフード中でARTバリアチップを用いて、無菌条件下で行った。

#### 【0146】

一定分量のDNAを、制限分析およびDNA濃度の決定のために取り出した。プラスミドDNA濃度を $1\text{mg}/\text{ml}$ に調節し、一定分量に分割し、後の使用のために-70℃で保管した。一定分量のプラスミドDNAを取り出して、無菌性に関して試験した。

#### 【0147】

pCHEK/HBA2プラスミドを用いたNSCLC細胞系の遺伝的改変

4つの一定分量の各NSCLC細胞系を適切なunMCBから取りだし、培養で成長させた。1週間に2度、新鮮な培地を細胞に供給した。遺伝子改変をする日に、細胞に新鮮な培地を供給した。4時間後、細胞をトリプシン処理し、血清を含む培地で、続いてPBSで洗浄した。PBS350 $\mu\text{l}$ 容量にて、細胞密度を1ml当たり $1\sim 2\times 10^7$ 細胞に調節し、15～20分間氷上でインキュベートした。pCHEK/HBA2プラスミド50 $\mu\text{g}$ を添加した。混合物をさら

に10～15分間、氷上でインキュベートした。次に細胞懸濁液を予冷したキュベットに移し、氷上でインキュベートした。5分後、キュベットを方形波エレクトロポレーター (Genetronic, San Diego, CA)に入れて、各パルスが $75\mu\text{s}$ 持続する $3000\text{V}/\text{cm}$ の3つのエレクトロポレーションパルスに曝露した。50mMのHepesを含有する新鮮な冷培地1mlを添加して、混合物を室温にて10分間インキュベートした。次に細胞を2回の分裂周期の間平板培養し、続いて選択を行った(トランスフェクション後72時間)。ハイグロマイシン $25\mu\text{g}/\text{l}$ を含有する新鮮な培地を培養液に添加した。遺伝子改変細胞を培養液で膨張させ、1つの細胞系につき総計4つの遺伝子改変マスター細胞バンク (gmMCB)として凍結させた。遺伝子改変細胞におけるpCHECK/HBA2プラスミドの存在が、PCRにより確認された。さらに、各gmMCBからの5つのバイアル(5%)を取り出し、好気性、嫌気性、マイコプラズマおよび真菌アッセイからなる無菌性試験のために使用した。

#### 【0148】

患者へのワクチン接種用細胞系の調製および同定

遺伝的改変後、腫瘍細胞を培養液で膨張させて、治療用途および試験に十分な細胞を成長させた。同一性、強度および安全性試験限界を通過した各細胞系からのクローンを、遺伝子改変マスター細胞バンク (gmMCB) および遺伝子改変作業用細胞バンク (gmWCB) の一定分量として、液体窒素中に冷凍保存した。患者へのワクチン接種前に、各gmWCBロットからの一定分量を解凍し、本発明者等がこれらのNSCLC細胞を含む種々の組織源の培養腫瘍細胞によるコロニー形成を完全に停止させることが可能であることを実証した照射線量である10,000cGyの線量で照射した。各ロットのからの一定分量に対して、安全性、強度および同一性試験を行い、細胞操作および凍結中に改変または汚染が起こっていないことを確実に保証した。ロットを、クローン原性、無菌性およびTGF $\beta$ 2ダウンレギュレーションに関して試験する。

#### 【0149】

患者へのワクチン接種の前の細胞の調製および試験

皮下免疫化の前に、4つの選択した細胞系の一定分量を短期間培養液に入れる

。遺伝子改変細胞を、培養皿から分離して、洗浄して、培地に再懸濁させ、10,000 cGyで照射し、洗浄して、乳酸加リンガー液に再懸濁させた。次にそれらを、無菌性および生存度に関して試験する。試験限界を通過した細胞のみを、患者のワクチン接種に使用する。

【0150】

【表5】

## 引用文献

- Ashley DM, Kong FM, Bigner DD, Hale LP. Endogenous expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits growth and tumorigenicity and enhances Fas-mediated apoptosis in a murine high-grade glioma model. *Cancer Res* 58(2): 302-309, 1998.
- Ashley DM, Sampson JH, Archer GE, Hale LP, Bigner DD. Local production of TGF  $\beta$ 1 inhibits cerebral edema, enhances TNF- $\alpha$  induced apoptosis and improves survival in a murine glioma model. *J Neuroimmunol* 86(1): 46-52, 1998.
- Baker JC and Harland RM. From receptor to nucleus: the Smad pathway. *Curr. Opin. Gen. Devel.* 7: 467-473, 1997.
- Bodmer S, Podlisny MB, Selkoe DJ, Heid I, and Fontana A. Transforming growth factor-beta bound to soluble derivatives of the beta amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 171: 890-897, 1990.
- Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A. Immunosuppression and transforming growth factor- $\beta$  in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor- $\beta$ 2. *J Immunol* 143(10): 3222-3229, 1989.
- Border, W.A., and Rouslahti E. Transforming growth factor- $\beta$  in disease: the dark side of tissue repair. *J.Clin. Invest.* 90: 1, 1992.
- Chen TC, Hinton DR, Yong VW, Hofman FM. TGF- $\beta$ 2 and soluble p55 TNFR modulate VCAM-1 expression in glioma cells and brain derived endothelial cells. *J Neuroimmunol* 73(1-2): 155-161, 1997.
- Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, and Fontana A. Differential expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J. Immunol.* 148: 1404-1410, 1992.
- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, and Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552, 1992.
- Dorige O, Shawler DL, Royston I, Sobol RE, and Fakhrai H. Synergy of Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) antisense and IL-2 gene therapy in the murine ovarian teratoma (MOT) model. *Gynecol Oncol* 71(2): 204-210, 1998.
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, and Mulligan R. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3539-3543, 1993.

## 引用文献 続き 1

Dubinett SM; Miller PW; Sharma S; Batra RK Gene therapy for lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 12(3): 569-94, 1998.

Eastham JA, Truong LD, Rogers E, Kattan M, Flanders KC, Scardino PT, Thompson TC. Transforming growth factor-beta 1: comparative immunohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. *Laboratory Investigation* 73(5): 628-635, 1995.

Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma. *J. Urology* 156(3): 953-957, 1996.

Fakhrai H, Shawler DL, Gjerset R, Koziol J, Naviaux R, Royston I, and Sobol RE. Cytokine gene therapy with interleukin-2 transduced fibroblasts: effects of IL-2 on anti-tumor immunity. *Human Gene Therapy* 6: 591-601, 1995.

Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, and Sobol RE. Eradication of established intracranial rat glioma by Transforming Growth Factor beta antisense gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2909-2914, 1996.

Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 4(5): 549-554, 1995.

Heldin CH, Miyazono K, and Dijke P. TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471, 1997.

Hirte, H., and Clark D.A. Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of Transforming Growth Factor-beta as a suppressive factor. *Cancer Immuno. Immunother.* 32: 296-302, 1991.

Holladay FP, Heitz T, Chen YL, Chiga M, and Wood GW. Successful treatment of a malignant rat glioma with cytotoxic T lymphocytes. *Neurosurgery* 31: 528-533, 1992.

Holladay FP, Heitz T, and Wood GW. Antitumor activity against established intracerebral gliomas exhibited by cytotoxic T lymphocytes, but not by lymphokine-activated killer cells. *J. of Neurosurgery* 77: 757-762, 1992.

Holladay FP, Lopez G, De M, Morantz RA, and Wood GW. Generation of cytotoxic immune responses against a rat glioma by in vivo priming and secondary in vitro stimulation with tumor cells. *Neurosurgery* 30: 499-504, 1992.

Huber BE, Richards CA, and krenitsky TA. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: An innovative approach for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 8039-8043, 1991.

## 引用文献 続き 2

- Jachimczak P, Bogdahn U, Schneider J, Behl C, Meixensberger J, Apfel R, Dorries R, Schlingensiepen KH, and Brysch W. The effect of Transforming Growth Factor- $\beta$ 2-specific phosphorothioate-anti-sense oligodeoxynucleotides in reversing cellular immunosuppression in malignant glioma. *J. Neurosurg.* 78: 944-951, 1993.
- Jakowlew SB, Mathias A, Chung P, Moody TW. Expression of transforming growth factor beta ligand and receptor messenger RNAs in lung cancer cell lines. *Cell Growth and Differentiation* 6(4): 465-476, 1995.
- Jennings MT, Hart CE, Commers PA, Whitlock JA, Martincic D, Maciunas RJ, Moots PL, Shehab TM. Transforming growth factor  $\beta$  as a potential tumor progression factor among hyperdiploid glioblastoma cultures: evidence for the role of platelet-derived growth factor. *J Neurooncol* 31(3): 233-254, 1997.
- Jennings MT, Kaariainen IT, Gold L, Maciunas RJ, Commers PA. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 are potential growth regulators for medulloblastomas, primitive neuroectodermal tumors, and ependymomas: evidence in support of an autocrine hypothesis. *Hum Pathol* 25(5): 464-475, 1994.
- Jennings MT, Pietenpol JA. The role of transforming growth factor  $\beta$  in glioma progression. *J Neurooncol* 36(2): 123-140, 1998.
- Kasid A, Bell GI, and Director EP. Effects of transforming growth factor beta on human lymphokine activated killer cell precursors: Autocrine inhibition of cellular proliferation and differentiation to immune killer cells. *J. Immunol.* 141: 690, 1988.
- Kim IY, Kim JH, Lang S, Kozlowski JM, Lee C. Successful treatment of established rat prostate cancer by transforming growth factor-1 antisense transfected tumor vaccine. American Urological Association, Inc. Annual Meeting. 1997.
- Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Annals of Surgery* 222(2): 155-162, 1995.
- Liau LM, Fakhrai H, Black KL. Prolonged survival of rats with intracranial C6 gliomas by treatment with TGF-beta antisense gene. *Neurol Res* 20(8): 742-747, 1998.
- Massague, J. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49: 437, 1987.
- Merzak A, McCrea S, Koocheckpour S, Pilkington GJ. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor- $\beta$  1. *Br J Cancer* 70(2): 199-203, 1994.



## 引用文献 続き 3

- Müller PW; Sharma S; Stofina M; Chen K; Zhu L; Paul RW; Dubinett SM. Dendritic cells augment granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)/herpes simplex virus thymidine kinase-mediated gene therapy of lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 5(6):380-9, 1998
- Naganuma H, Sasaki A, Satoh E, Nagasaka M, Nakano S, Ise S, Tasaka K, Nukui H. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits interferon-gamma secretion by lymphokine-activated killer cells stimulated with tumor cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 36(11): 789-795, 1996.
- Nandan D, Reiner NE. TGF-beta attenuates the class II transactivator and reveals an accessory pathway of IFN-gamma action. *Journal of Immunology* 158(3): 1095-1101, 1997.
- Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, and Oldfield EH. In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of Brain tumors in rats. *Cancer Research* 53: 83-88, 1993.
- Ramanathan RK; Belani CP. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer-past, present, and future. *Semin Oncol.* 24(4):440-54, 1997
- Ransohoff J, Koslow M, and Cooper PR. Cancer of the central nervous system and pituitary. In: *American Cancer Society Textbook of Clinical Oncology*. Holleb AI, Fink DJ, and Murphy GP, editors, pp 329-337, 1991.
- Reok AM, Kerhl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane HC, and Fauci AS. Effects of transforming growth factor-beta on the function of natural killer cells. Depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol.* 136 (10): 3916-3920, 1986.
- Roth JA; Swisher SG; Merritt JA; Lawrence DD; Kemp BL; Carrasco CH; El-Naggar AK; Fossella FV; Glisson BS; Hong WK; Khuri FR; Kurie JM; Nesbitt JC; Pisters K; Putnam JB; Schump DS; Shin DM; Walsh GL. Gene therapy for non-small cell lung cancer: a preliminary report of a phase I trial of adenoviral p53 gene replacement. *Semin Oncol.* 25(3 Suppl 8):33-7, 1988.
- Sobel RE; Shawler DL; Carson C; Van Beveren C; Mercola D; Fakhrizadeh H; Garrett MA; Barone R; Goldfarb P; Bartholomew RM; Brostoff S; Carlo DJ; Royston I; Gold DP. Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clin. Cancer Res.* 5(9):2359-65, 1999.
- Sporn M., Roberts, A.B., Wakefield L.M., and Asoian R.K. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 233: 532-534, 1986.

## 引用文献 続き 4

Stiles JD, Ostrow PT, Balos LL, Greenberg SJ, Plunkett R, Grand W, Heffner RR Jr. Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(4): 435-439, 1997.

Swisher SG; Roth JA; Nemunaitis J; Lawrence DD; Kemp BL; Carrasco CH; Connors DG; El-Naggar AK; Fossella F; Glisson BS; Hong WK; Khuri FR; Kurie JM; Lee JJ; Lee JS; Mack M; Merritt JA; Nguyen DM; Nesbitt JC; Perez-Soler R; Pisters KM; Putnam JB Jr; Richi WR; Savin M; Waugh MK; et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 5;91(9):763-71, 1999

Takenoyama M; Yasumoto K; Harada M; Sugimachi K; Nomoto K. Antitumor response of regional lymph node lymphocytes in human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 47(4):213-20, 1998.

Trojan J, Blossey BK, Johnson TR, Rudin SD, Tykocinski ML, Han J, and Han J. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 4874-4878, 1992.

Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, Han J, Tykocinski ML, and Han J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science* 259: 94-96, 1993.

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, and Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- $\beta$ . *Nature* 334:260, 1988.

Yamada N, Kato M, Yamashita H, Nister M, Miyazono K, Heldin CH, Funa K. Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. *International Journal of Cancer* 62(4): 386-392, 1995.

Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, and Wang XF. Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor  $\beta$ -inducible DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 17 (12): 7019-7028, 1997.

【0151】

明瞭性および理解の目的で、やや詳細に本発明を説明してきたが、本発明の本来の範囲を逸脱することなく形態および細部の様々な変更がなされ得ることを当業者は理解するであろう。上述に参照したすべての図、表および付録、ならびに特許、出願および刊行物は、参照により本明細書に援用される。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Fakhrai, Habib

<120> Genetically Modified Cells Expressing A  
TGF-beta Inhibitor, The Cells Being Lung cancer Cells

<130> ADB10.003PCT

<150> US 60/193,497

<151> 2000-05-31

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 927

<212> DNA

<213> Human Transforming Growth Factor Beta-2

<400> 1

```

aattcaagca ggatacgttt ttctgttggg cattgactag attgtttgca aaagtttcgc 60
atcaaaaaca acaacaacaa aacaacaac tctccttgat ctatactttg agaattgttg 120
atttcttttt ttattctga cttttaaaaa caactttttt ttccactttt ttaaaaaatg 180
cactactgtg tgctgagcgc ttttctgac ctgcactctg tcacggtcgc gctcagcctg 240
tctacctgca gcacactcga tatggaccag ttcatgcgca agaggatcga ggcgatccgc 300
gggcagatcc tgagcaagct gaagctcacc agtccccag aagactatcc tgagcccgag 360
gaagtcccc cggaggtgat ttccatctac aacagcacca gggacttgct ccaggagaag 420
gcgagccgga ggcgggcgc ctgcgagcgc gagaggagcg acgaagagta ctacgccaag 480
gaggtttaca aaatagacat gccgccttc ttccccctccg aaactgtctg cccagttgtt 540
acaacacct ctggctcagt gggcagcttg tgctccagac agtcccaggt gctctgtggg 600
taccttgatg ccaccccgcc cactttctac agaccctact tcagaattgt tcgatttgac 660
gtctcagcaa tggagaagaa tgcttccaat ttggtgaaag cagagttcag agtctttcgt 720
ttgcagaacc caaaagccag agtgccctgaa caacggattg agctatatca gattctcaag 780
tccaaagatt taacatctcc aaccagcgc tacatcgaca gcaaagttgt gaaaacaaga 840
gcagaaggcg aatggctctc cttcgatgta actgatgctg ttcatgaatg gcttcaccat 900
aaagacagga acctgggatt taaaata                                     927

```

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Vector Sequence Flanking TGF-beta2 insert

<400> 2

tgctctggatc cggccttgcc ggccctcga

28

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Vector Sequence Flanking TGF-beta2 Insert

<400> 3

agcttgctag cagctggtag ccagct

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K48/00 A61P35/00 C12N5/10 A61K35/42		International Application No. PCT/US 01/10339
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 02143 A (SIDNEY KIMMEL CANCER CENTER) 1 February 1996 (1996-02-01) the whole document	1-15, 17, 20
X	FAKHRAI H ET AL: "IMMUNIZATION WITH TGF-82 ANTISENSE GENE MODIFIED TUMOR CELLS ERADICATES INTRACRANIAL GLIOMAS" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 36, 1995, pages 463-E, XP001026154 ISSN: 0197-016X abstract	1-11, 20
Y	---	12, 13
Y	WO 93 07906 A (SAN DIEGO REGIONAL CANCER CENTER) 29 April 1993 (1993-04-29) the whole document	12, 13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *a* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 July 2002		Date of mailing of the international search report 02/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Siatou, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 01/10339

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WD 96 25178 A (THE UNIVERSITY OF UTAH) 22 August 1996 (1996-08-22) claims 1-25	1-20
Y	----- FISCHER J R ET AL: "CONSTITUTIVE SECRETION OF BIOACTIVE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 BY SMALL CELL LUNG CANCER CELL LINES" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 30A, no. 14, 1994, pages 2125-2129, XP000986137 ISSN: 0959-8049 page 2128, right-hand column, line 1 -page 2129, left-hand column	1-20
A	----- NORGAARD P ET AL: "EXPRESSION AND AUTOREGULATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA RECEPTOR MRNA IN SMALL-CELL LUNG CANCER CELL LINES" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 9, May 1996 (1996-05), pages 1037-1043, XP001041824 ISSN: 0007-0920 abstract	1-20
A	----- ASSELIN-PATUREL C ET AL: "QUANTITATIVE ANALYSIS OF TH1, TH2 AND TGF-BETA1 CYTOKINE EXPRESSION IN TUMOR, TIL AND PBL OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 77, no. 1, 3 July 1998 (1998-07-03), pages 7-12, XP001053407 ISSN: 0020-7136 abstract	1-20
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP 01/10339**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claim 3 and 4-20, insofar as they refer back to claim 3, are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/US 01/10339

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9602143	A	01-02-1996	US 5772995 A	30-06-1998
			AU 711730 B2	21-10-1999
			AU 3217895 A	16-02-1996
			CA 2195334 A1	01-02-1996
			EP 0771147 A1	07-05-1997
			JP 2001526622 T	18-12-2001
			WO 9602143 A1	01-02-1996
			US 6120763 A	19-09-2000
WO 9307906	A	29-04-1993	AT 188125 T	15-01-2000
			CA 2121127 A1	29-04-1993
			DE 69230506 D1	03-02-2000
			DE 69230506 T2	21-06-2000
			DK 668781 T3	17-04-2000
			EP 0668781 A1	30-08-1995
			ES 2144426 T3	16-06-2000
			GR 3032660 T3	30-06-2000
			JP 7503455 T	13-04-1995
			WO 9307906 A1	29-04-1993
			US 5681562 A	28-10-1997
WO 9625178	A	22-08-1996	US 5824655 A	20-10-1998
			AU 694621 B2	23-07-1998
			AU 4922096 A	04-09-1996
			CA 2213198 A1	22-08-1996
			EP 0809517 A1	03-12-1997
			JP 11500128 T	06-01-1999
			WO 9625178 A1	22-08-1996



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	11/00	A 6 1 P	11/00
	35/00		35/00
	37/02		37/02
	37/04		37/04
	43/00		43/00
	1 1 1		1 1 1
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	4C084 AA02 AA13 BA44 CA18 CA25 CA27 CA53 DA01 DA12 DA13 DA14 DA15 DA16 DA17 DA18 DA27 MA02 NA14 ZA59 ZB02 ZB05 ZB09 ZB26 ZC41 4C085 AA14 BB17 CC07 CC08 CC21 CC29 DD62 EE01 EE03 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA59 ZB02 ZB05 ZB09 ZB26 ZC41 4C087 AA01 AA02 BB33 BB65 CA04 CA05 CA12 CA16 NA14 ZA59 ZB02 ZB05 ZB09 ZB26 ZC41		

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成20年5月15日(2008.5.15)

【公表番号】特表2003-528930(P2003-528930A)

【公表日】平成15年9月30日(2003.9.30)

【出願番号】特願2001-572145(P2001-572145)

【国際特許分類】

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 35/42 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 35/42

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 43/00 1 1 1

【手続補正書】

【提出日】平成20年3月24日(2008.3.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 T G F  $\beta$  の発現を低減するのに有効な T G F  $\beta$  阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む、治療上有効な量の遺伝的に改変された細胞を含む組成物であって、前記遺伝的に改変された細胞は、肺癌細胞である組成物。

【請求項2】 前記肺癌細胞は、非小細胞肺癌（N S C L C）細胞である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 前記肺癌細胞は、小細胞肺癌（S C L C）細胞である、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】 前記 T G F  $\beta$  は、T G F  $\beta$  - 1 である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】 前記 T G F  $\beta$  は、T G F  $\beta$  - 2 である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】 前記 T G F  $\beta$  は、T G F  $\beta$  - 3 である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

載の組成物。

【請求項 7】 前記遺伝的に改変された細胞は、自己細胞である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】 前記遺伝的に改変された細胞は、同種異系細胞である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】 前記遺伝的に改変された細胞は、自己細胞および同種異系細胞の混合物である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】 前記遺伝的に改変された細胞は、免疫賦活性効果を有する 1 つまたはそれ以上のサイトカインをさらに発現する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】 前記 1 つまたはそれ以上のサイトカインは、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-8、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12、インターロイキン-15、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、腫瘍壊死因子- $\alpha$ 、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子からなる群から選択される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】 前記 TGF $\beta$  阻害剤は、アンチセンスである、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】 前記 TGF $\beta$  阻害剤は、配列番号 1 の配列を有するアンチセンスである、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】 前記 TGF $\beta$  阻害剤は、リボザイムである、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】 前記 TGF $\beta$  阻害剤は、優性ネガティブ突然変異体である、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】 前記 TGF $\beta$  阻害剤は、抗体である、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 17】 前記 TGF $\beta$  阻害剤は、TGF $\beta$  受容体および Smad タンパク質相互作用を妨げる、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 18】 前記組成物は、単位投薬形態で提供される、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 19】 前記組成物は、肺癌+を有する被験体の生存を延ばすためのものである、請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 20】 肺癌を有する被験体の生存を延ばすための薬剤の調製のための、TGF $\beta$  の発現を低減するのに有効な TGF $\beta$  阻害剤を発現する遺伝的構築物を含む、治療上有効な量の遺伝的に改変された細胞を含む組成物の使用であって、前記遺伝的に改変された細胞は、肺癌細胞である使用。